

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Пермский национальный исследовательский
политехнический университет»

ХИМИЯ. ЭКОЛОГИЯ. УРБАНИСТИКА

*Материалы
всероссийской научно-практической конференции
(с международным участием)*

Том 2

г. Пермь, 22–23 апреля 2021 г.

Издательство
Пермского национального исследовательского
политехнического университета
2021

УДК 504.06+711+54.057+504.054+504.064.2:54
Х46

Приведены результаты исследований в области экологии, химической технологии и биотехнологии, направленных на обеспечение принципов энерго- и ресурсосбережения.

Главный редактор

В.Г. Рябов, д-р техн. наук, профессор

Ответственный редактор

А.В. Портнова, канд. хим. наук, доцент

Редакционная коллегия

В.В. Вольхин, д-р хим. наук, профессор

В.З. Пойлов, д-р техн. наук, профессор

Я.И. Вайсман, д-р мед. наук, профессор

М.Г. Бояришинов, д-р техн. наук, профессор

Л.В. Рудакова, д-р техн. наук, профессор

Л.С. Щепетева, канд. техн. наук, доцент

М.В. Песин, д-р техн. наук, профессор

ISBN 978-5-398-02532-3 (общ.)

ISBN 978-5-398-02534-7 (Т. 2)

© ПНИПУ, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

<i>А.Е. Азанова, А.Ю. Максимов</i> Рост на селективной среде и проявление амидазной активности у бактерий, способных к энантиоселективному биокаталитическому синтезу аминокислот	8
<i>Н.Н. Анашкин, А.В. Портнова</i> Непрерывная технология ввода жидких кормовых добавок в комбикорма на стадии транспортировки	12
<i>И.И. Анашкина, Е.Н. Анашкина, А.В. Портнова</i> Совершенствование метода определения протеолитической активности ферментов, выделяемых <i>B.Subtilis</i> на разных питательных средах	17
<i>К.А. Бабинцев, А.В. Портнова</i> Определение основных характеристик белкового растительного продукта, полученного с применением ферментации	22
<i>Э.Р. Бакиева, Л.В. Литвиненко, А.В. Тищенко</i> Влияние тяжелых металлов на морфометрические параметры клеток актинобактерий	26
<i>А.А. Балужева, Д.А. Веретенникова, А.С. Олькова, Е.С. Ивашкина, Е.В. Баньковская, А.В. Кудинов, Д.В. Першин</i> Природные углеводороды – перспективные лекарственные средства	31
<i>А.М. Баранова, Я.В. Лобанова</i> Изучение метаболической стабильности ксенобиотиков	36
<i>И.С. Безматерных, Л.В. Волкова</i> Изучение влияния ферментативного гидролиза на получение биологически активной субстанции из побочных продуктов фракционирования иммуноглобулинов	40
<i>В.А. Васильева, Н.С. Евдокимов, В.Р. Сафиулова, А.А. Фомичева</i> Биотехнологические направления использования <i>Chlorella vulgaris</i>	46

Д.А. Веретенникова, А.А. Балужева, А.С. Олькова, Е.В. Баньковская, О.В. Гашкова, И.П. Рудакова, И.В. Тонкоева	
Синтез и исследование острой токсичности некоторых ариламидов аминокарбоновых кислот	52
С.Е. Возисов, А.Ю. Максимов	
Теоретические основы компостирования избыточного активного ила очистных сооружений нефтехимических предприятий	57
О.Ш. Гоголишвили, Е.Н. Решетова	
Адсорбция энантиомеров 3-фенилмолочной кислоты на хиральной неподвижной фазе с привитым антибиотиком эремомицином	61
К.С. Давыдова, Т.В. Полюдова, В.П. Коробов	
Адгезия бактерий на адсорбционно модифицированных поверхностях полимеров	67
А.А. Данько, Н.Б. Ходяшев	
Выделение культуры <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> , описание ее морфологических и отдельных культуральных свойств	72
В.А. Дьячкова, Л.И. Кононова, В.П. Коробов, И.А. Пьянков	
Оценка влияния мембранных липидов и гидрофобности клеток стафилококков на их чувствительность к хитозанам	77
В.В. Егорова, Ю.Г. Максимова	
Иммобилизованные биокатализаторы на основе штаммов бактерий с липазной и амилазной активностью	82
У.А. Елизарова, Ю.А. Смятская	
Микроводоросли <i>Chlorella</i> – перспективный продуцент липидов с высоким спектром биологической активности.....	88
И.В. Желнина, О.И. Бахирева	
Биотехнологическая очистка воды от ионов кобальта	92
Г.З. Ибрагимова, Н.Б. Ходяшев	
Выделение и идентификация молочнокислых бактерий из козьего молока	96
М.С. Иванов, А.В. Портнова	
Применение альтернативных технологий получения слабоалкогольных напитков.....	100
А.М. Игнатова, М.А. Землянова	
Оценка экологической токсичности наночастиц оксида алюминия...	105

<i>А.М. Игнатова, Г.З. Файнбург, М.Н. Игнатов</i> Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения и специализированной упаковки для обеспечения стерильности эндопротезов	109
<i>А.В. Ионов, И.А. Пермякова</i> Влияние состава и кислотности среды на скорость роста микроорганизмов, способных к биотрансформации глицеринсодержащих отходов производства эфиров жирных кислот	113
<i>Я.А. Климова, М.В. Степанова, Л.Д. Аснин</i> Хроматографическое удерживание пентапептидов на хиральных неподвижных фазах с привитым антибиотиком ристоцетином А.....	118
<i>М.А. Клочкова, Д.И. Зиганшина, А.В. Кудинов, Л.Д. Аснин</i> Растворимость лейциллейцина в смесях вода–метанол	123
<i>Н.Е. Ковина, Е.А. Фарберова, Е.А. Тиньгаева, А.С. Максимов</i> Исследование возможности биохимического концентрирования лантана на углеродных сорбентах	127
<i>Н.М. Крылов</i> Исследование радикалсвязывающей активности органических веществ.....	131
<i>А.А. Лобанова, О.И. Бахирева</i> Изучение культуры микроорганизмов для биологической очистки сточных вод от формальдегида	136
<i>Я.В. Лобанова, А.А. Ботева</i> Взаимодействие липофильных ксенобиотиков с биологическими системами при оценке метаболической стабильности поллютантов	140
<i>А.С. Лопатина, А.Ю. Максимов</i> Биосинтез индол-3-уксусной кислоты бактериями рода <i>Azospirillum</i> в зависимости от условий культивирования.....	145
<i>О.Ю. Маньковская, О.И. Бахирева, М.М. Соколова</i> Изучение кинетических закономерностей процесса культивирования микроорганизмов в зависимости от концентрации субстрата	150
<i>Л.А. Миссорина, А.Ю. Максимов</i> Выделение штамма, разлагающего эфиры фталевой кислоты, и изучение биокинетики разложения диметилфталата и дибутилфталата.....	155

<i>В.С. Новоселова, Е.А. Фарберова, Г.А. Старкова, А.С. Максимов</i>	
Исследование возможности биохимического концентрирования европия на поверхности углеродных сорбентов	160
<i>Е.А. Першин, И.С. Пирожкова, И.А. Пермякова</i>	
Переэтерификация триацилглицеридов растительного масла с использованием липазных и микробных биокатализаторов	164
<i>Д.Е. Петухова, О.И. Бахирева, Ю.Н. Колесова</i>	
Изучение возможности применения ряски для очистки природных вод от ионов стронция	169
<i>И.С. Пирожкова, И.А. Пермякова</i>	
Оптимизация состава глицеринсодержащей среды для культивирования дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i>	173
<i>В.И. Сагидуллина, А.В. Ахова, А.Г. Ткаченко</i>	
Поиск бактерий – продуцентов 1,5-диаминопентана.....	177
<i>С.Н. Усанина, А.Ю. Максимов</i>	
Селекция бактерий, обладающих протеазной активностью, из природных закисленных сред.....	182
<i>А.С. Филипенко, Ю.М. Стасюк, С.Б. Чачина</i>	
Биологическая доочистка сточных вод. Исследование сточных вод на химические показатели	187
<i>Р.А. Хасанова, А.В. Ахова, А.Г. Ткаченко</i>	
Поиск бактерий – продуцентов 1,4-диаминобутана.....	192
<i>Е.А. Цыпкина, Л.С. Пан</i>	
Получение биосорбентов для обеззараживания воды на основе морских водорослей и йода	197
<i>С.Б. Чачина, Е.П. Чачина</i>	
Вермиремидиация грунта, загрязненного отработанным машинным масляным топливом (50 г/кг), с применением вермикультур <i>D. Veneta</i> , <i>E. Andrei</i> , <i>E. Fetida</i> , а также их пробиотических культур	201
<i>О.С. Шевченко, С.В. Нехорошев</i>	
Минеральный состав листьев осины обыкновенной, произрастающей на территории Ханты-Мансийского автономного округа – Югры	206
<i>О.Л. Широбокова, Е.В. Лепехина</i>	
Ферментация растительного молока	210

О.А. Шулькина, А.Ю. Максимов

Математическое моделирование влияния концентраций субстратов на скорость роста штамма <i>Alcaligenes faecalis</i> 2	214
--	-----

CHEMISTRY. ECOLOGY. URBANISTICS

A.V. Rullo, A.D. Badikova,

D.A. Danilova, R.Kh. Masagutov

Geochemical exploration of oil and gas in the subsurface on a modified carbon adsorbent using projection approaches to the analysis of a data array of chromatography-mass spectrometry	220
--	-----

V.E. Burov, A.N. Gallyamov, O.A. Fedotova, V.Z. Poilov

The ultrasonic treatment influence on pH solution of hydrochloric amine	224
--	-----

L.K. Molokov, I.V. Rukavishnikova

Environmental impact of wind power generation	228
---	-----

V.K. Savelieva, L.S. Pan

Study of modification of the surface of seaweed with carboxylic acids in order to obtain biosorbents for sorption of cesium from aqueous solutions	233
--	-----

A.S. Olkova, A.A. Balueva, D.A. Veretennikova, E.I. Ivashkina,

E.V. Bankovskaya, A.V. Kudinov, D.V. Pershin

Direct-running petrol fractions as medicines.....	237
---	-----

A.G. Bortnik, A.V. Botin, N.A. Medvedeva, S.U. Balandina

The study of changes in the mechanical properties of stell under the influence of micromycete corrosion	241
--	-----

D.A. Kochergina, N.Yu. Lyubimova, T.A. Gertsen

Inertia moments of the molecules in the course of physics for students of chemical fields	246
--	-----

M.I. Sidelnikov

Research of biologically active compounds ability to diffuse through the gastrointestinal tract wall using parallel artificial membranes	249
--	-----

УДК 579.222.4

А.Е. Азанова, А.Ю. Максимов

РОСТ НА СЕЛЕКТИВНОЙ СРЕДЕ И ПРОЯВЛЕНИЕ АМИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ У БАКТЕРИЙ, СПОСОБНЫХ К ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОМУ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОМУ СИНТЕЗУ АМИНОКИСЛОТ

Рассмотрен процесс микробного биокаталитического синтеза аминокислот из амидов аминокислот и его преимущества перед химическим катализом. Исследованы рост и амидазная активность бактерий, селекционированных по способности к энантиоселективному биокаталитическому синтезу аминокислот.

Ключевые слова: аминокислоты, биокатализ, микробиологический синтез, почвенные актинобактерии.

A.E. Azanova, A.Yu. Maksimov

GROWTH ON A SELECTIVE MEDIUM AND AMIDASE ACTIVITY OF BACTERIA CAPABLE OF ENANTIOSELECTIVE BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF AMINO ACIDS

This article contains information about the essence of microbiological synthesis and its advantages over chemical synthesis. Characteristics of microorganisms – producers of amino acids. Growth curves of the studied microbial cultures, parameters of their amidase activity.

Keywords: amino acids, biocatalysis, microbiological synthesis, soil action-bacteria.

В данной работе мы фокусируемся на анализе кинетики роста и амидазной активности микроорганизмов – продуцентов аминокислот. Тема микробиологического синтеза аминокислот имеет огромное внимание в настоящее время. На мировом рынке продуктов ферментации (без учета этанола) после антибиотиков аминокислоты выступают второй по значимости категорией продукции,

причем продукты ферментации демонстрируют наиболее высокие темпы роста. В данном аспекте тема представленного исследования чрезвычайно актуальна.

Микробиологический синтез – это процесс воспроизведения микроорганизмами в процессе жизнедеятельности структурных элементов и метаболитов за счет ферментных систем, находящихся в клетке [1]. Биокаталитический микробный синтез обычно представляет собой процесс получения продукта за счет одностадийного (реже – в несколько стадий) ферментативного превращения субстрата. Большое количество продуктов, образующихся в ходе биокатализа, обладает физиологической активностью и потому имеет практическую значимость в народном хозяйстве. Существенное преимущество микробиологического синтеза аминокислот перед химическим методом заключается в получении их непосредственно в виде природных изомеров (L-формы) в случае биосинтеза или в большинстве случаев микробного синтеза либо, при использовании продуцентов другого фермента, – D-формы в избыточном или энантиомерно-чистом виде [2].

Характерной особенностью искусственно культивированных микроорганизмов-продуцентов является их способность к сверхсинтезу, что означает избыточное образование отдельных продуктов метаболизма (многих аминокислот, нуклеотидов, витаминов) или ферментов, количество которых превышает естественную потребность микробной клетки.

В работе использованы штаммы микроорганизмов из коллекции Лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН: *Microbacterium invictum* lc18, lc22, lc24, *Microbacterium murale* lc25, ac3, *Dietzia maris* ac1, ac6, ранее демонстрировавшие способность к энантиоселективному биокаталитическому синтезу аминокислот [3].

Проведен высев культур, заложенных на хранение, на полноценную среду и селективную среду. Чистоту культуры определяли по росту на полноценной среде. Для дальнейшей работы брали однородные колонии, соответствующие признакам исходной культуры. Чистые культуры засевали на жидкую питательную среду с целью наращивания биомассы и определения амидазной активности.

Для культивирования использовали среду N следующего состава (г/л): NaCl – 0,5, K₂HPO₄ – 4, KH₂PO₄ – 1, агар-агар – 15, раствор солей 2-валентных металлов – 2,5 мл [4]. В качестве един-

ственного источника углерода и азота в среду вносили ацетамид (6,25 г/л). Культуры, не имеющие фермента амидазы, не способны вырасти на подобной среде, поэтому ацетамид является также селективным агентом. Исследуемые культуры были засеяны в 50 мл жидкой питательной среды *N* в конические колбы объемом 50 мл и инкубированы на орбитальном термостатируемом шейкере при 30 °С и скорости вращения 160 об/мин в течение 192 ч. В процессе роста измеряли оптическую плотность культуральной среды при длине волны 540 нм.

Исследовали рост культур бактерий. Измерили оптическую плотность культуральной среды при длине волны 540 нм (рисунок).

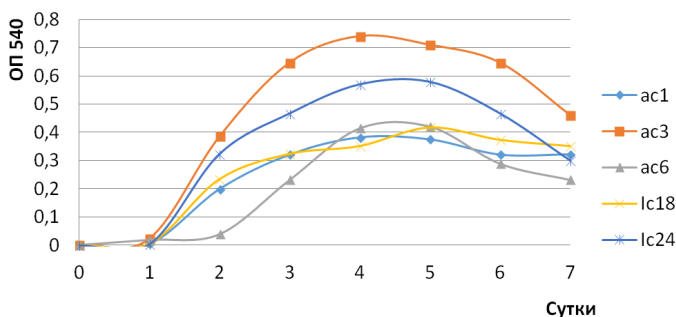


Рис. Кривые роста исследуемых микроорганизмов на селективной среде

Амидазная активность по отношению к акриламиду после 72 ч роста

Штамм	Активность амидазы, мкмоль/мг/мин
<i>Microbacterium invictum</i> ac2	2,4
<i>Microbacterium murale</i> ac3	3,9
<i>Dietzia maris</i> ac6	3,6
<i>Microbacterium invictum</i> lc18	1,3
<i>Microbacterium invictum</i> lc22	1,4
<i>Microbacterium invictum</i> lc24	1,6
<i>Microbacterium murale</i> lc25	2,1

Амидазную активность культур оценивали спектрофотометрическим методом по возрастанию оптической плотности реакци-

онной среды в ходе проведения минутной реакции с акриламидом в качестве субстрата при длине волны 230 нм (см. выше).

Установлено, что наибольшую амидазную активность при росте в условиях селективной среды проявляют культуры *M. murale* ac3 и *D. maris* ac6. При этом максимальная плотность культуры также наблюдалась у штамма *M. murale* ac3.

Работа выполнена в рамках государственного задания АААА-А19-119112290009-1.

Список литературы

1. Безбородов А.М., Квеситадзе Г.И. Микробиологический синтез. – СПб.: Проспект науки, 2011. – 141 с.
2. Wolfgang L., Klaus H., Karlheinz D. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – Vol. 69. – P. 1–8.
3. Максимова Ю.Г., Горбунова А.Н., Демаков В.А. Стереоселективная биотрансформация фенилглициннитрила гетерогенным биокатализатором на основе иммобилизованных бактериальных клеток и ферментного препарата // Докл. Академии наук. – 2017. – Т. 474, № 2. – С. 248–250.
4. Максимов, А. Ю. Влияние нитрилов и амидов на рост и нитрилгидратазную активность штамма *Rhodococcus* sp. gt1 / А.Ю. Максимов [и др.] // Прикл. биохим. микробиол. – 2003. – № 1. – С. 63–68.

Об авторах

Азанова Елена Евгеньевна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и Биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: al_azanova@mail.ru.

Максимов Александр Юрьевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал ПФИЦ УрО РАН; e-mail: almaks1@mail.ru.

Н.Н. Анашкин, А.В. Портнова

НЕПРЕРЫВНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ВВОДА ЖИДКИХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК В КОМБИКОРМА НА СТАДИИ ТРАНСПОРТИРОВКИ

Технология ввода жидких ферментных добавок на стадии транспортировки является перспективным способом получения обогащенного кормового сырья. Предложен вариант доработки конструкции ленточного конвейера оросительными устройствами, с целью модернизации линии транспортировки производства комбикормов, что позволит убрать из цикла промежуточный реактор, применяемый для перемешивания ферментной жидкости и сорбента (мукомольных отходов), а также сократить время производства конечного продукта.

Ключевые слова: сорбент, кормовые добавки, ферменты, транспортировка комбикорма.

N.N. Anashkin, A.V. Portnova

CONTINUOUS TECHNOLOGY FOR THE INTRODUCTION OF LIQUID FEED ADDITIVES INTO MIXED FEEDS AT THE TRANSPORTATION STAGE

The technology of introducing liquid enzyme additives at the transportation stage is a promising way to obtain enriched feed raw materials. A variant of modifying the design of the belt conveyor with irrigation devices is proposed, in order to modernize the mixed feeds production transportation line, which will allow removing the intermediate reactor used for mixing the enzyme liquid and sorbent (flour waste) from the cycle, as well as reducing the production time of the final product.

Keywords: sorbent, feed additives, enzymes, transportation of mixed feeds.

Современная технология производства комбикормов предусматривает введение в них различных питательных веществ, аминокислот, ферментов. Основными потребителями кормовых ферментов в России являются такие отрасли, как птицеводство и животноводство.

Для получения ферментов используются различные виды микроорганизмов: бактерии, грибы, дрожжи, актиномицеты [1].

Ферменты регулируют большинство биохимических процессов, хорошо расщепляют клетчатку зерновых кормов, способствуют лучшему усвоению питательных веществ, обеспечивая

тем самым обмен веществ. Механизм действия ферментов заключается в расщеплении веществ высокомолекулярной природы (крахмал, белки, липиды) до легкоусвояемых веществ, в виде которых они всасываются.

В настоящее время для улучшения усваиваемости кормов и создания биокормов на основе пробиотиков используют бактерии *Bacillus Subtilis* [2], которые обладают протеолитическими и амилитическими свойствами, быстро растут на дешевых субстратах, не токсичны для животных и окружающей среды. У живых культур спорообразующих бактерий из рода *Bacillus* высокая стойкость к разным диапазонам температур, кислотности желудка, они являются антагонистами ко многим патогенным микроорганизмам. Добавление *Bacillus Subtilis* в корм обеспечивает улучшение пищеварения, стимуляцию обменных и иммунных процессов организма и нормализацию кишечного микробиоценоза.

При попадании бактерий *Bacillus Subtilis* в желудок вместе с кормом происходит расщепление труднопереваримых компонентов комбикорма и перевод их в усваиваемую форму, нормализация углеводного обмена за счет ферментов и за счет подселения выделяемых данными микроорганизмами в ЖКТ (табл. 1).

Таблица 1

Основные виды ферментов и их действие [3]

Фермент	Действие	Результат
Амилаза	Расщепляет зерновой крахмал до декстринов и сахаров	Повышает усвояемость зерна в комбикорме
Протеаза	Расщепляет протеины до пептидов и аминокислот	Улучшает перевариваемость протеина
Целлюлаза	Расщепляет целлюлозу до низкомолекулярных углеводов и глюкозы	Повышается усвояемость корма
Фитаза	Улучшает доступность фосфора	Уменьшается потребность как в неорганических, так и в органических источниках фосфора

В лабораторных условиях микроорганизмы *Bacillus Subtilis* были выделены из настоя сухой травы и культивировались на различных средах, в которых казеин заменили более дешевым растительным белком; проявляли хорошую протеолитическую и амилитическую активность.

Таблица 2

Химический состав и питательная ценность
отрубей, % (средние данные) [1]

Отруби	Протеин	Жир	Клетчатка
Пшеничные	15,3	4,0	9,5
Ржаные	14,5	3,2	6,9
Ячменные	13,9	3,5	12,8
Кукурузные	10,9	3,9	6,4
Рисовые	7,1	7,0	34,3

Ферменты для производства кормов высушивают и смешивают с наполнителем (отходы мукомольной промышленности) [2]. Нами предложен способ использовать сразу культуральную жидкость, что упрощает и удешевляет процесс (табл. 2).

Культуральную жидкость, состоящую из бактерий *Bacillus Subtilis*, их спор, ферментов, аминокислот и компонентов питательной среды, наносят через форсунки, установленные на рампе ленточного конвейера, на стадии транспортировки.

Подготовленный для обогащения комбикорм подается на ровную поверхность ленточного транспортера, далее с помощью выравнивающих устройств продукт равномерно распределяется по поверхности ленты конвейера оптимальным слоем 3–4 см и входит в зону обогащения. В вышеуказанной зоне на раму конвейера установлены поперечные рампы с оросительными форсунками, которые осуществляют подачу культуральной жидкости на поверхность корма. На протяжении от начала зоны обогащения продукции до склиза (дополнительный элемент промышленного транспортера, представляющий собой наклонный желоб из стали, с помощью которого осуществляется перемещение продукта к месту дальнейшей переработки) установлен поддон сбора культуральной жидкости с целью ее повторного использования (рисунок).

Предусмотрено несколько вариантов дальнейшего использования обогащенного комбикорма: либо транспортировка в распределительный кормовочный цех, либо сушка при 70 °С и подача продукта в цех упаковки. В обоих случаях полученный продукт после непродолжительного времени обработки готов к использованию как в качестве самостоятельного корма, так и в виде биодобавки к другим кормам.

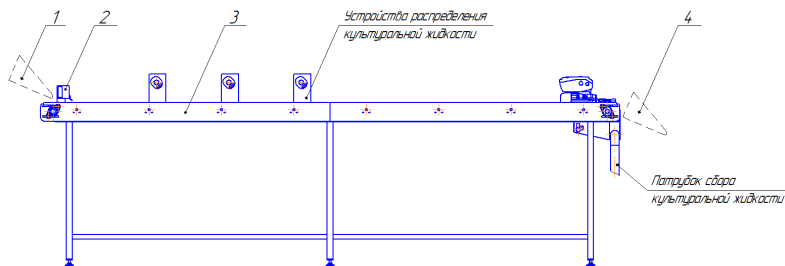


Рис. Общий вид ленточного транспортера с зоной обогащения:
 1 – прием сыпучего сырья; 2 – распределение по конвейерной ленте ровным слоем; 3 – зона обогащения культуральной жидкостью;
 4 – выгрузка готового продукта на фасовку

Предложенная технология позволяет из малоценных отходов растительного сырья при минимальных энергозатратах получить готовую продукцию с высоким содержанием белка при одновременном повышении усвояемости корма. Преимуществом данной технологии является отсутствие необходимости стерилизации готового продукта, так как не происходит рост токсичных микроорганизмов благодаря подавлению их развития выбранной культурой.

Использование микроорганизмов *Bacillus Subtilis* и их спор на растительном сорбенте позволяет применить безотходную технологию получения пробиотического корма [3], а также рекомендовать отказ от добавления антибиотиков, так как споры *Bacillus Subtilis*, входящие в состав корма, проходя кислую среду желудка, уже подавляют патогенные и условно патогенные микроорганизмы ЖКТ, стимулируя тем самым в несколько раз развитие нормофлоры.

Список литературы

1. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук [и др.]; под ред. А.И. Нетрусова – М.: Академия, 2005. – 608 с.
2. Иванова Е.П., Скалозуб О.М. Биотехнология кормов: учеб. пособие для студ. вузов). – Уссурийск, 2015. – 92 с. URL: www.de.primacad.ru.

3. Пискунова Н.А., Карнаухов И.Е. Использование отходов перерабатывающих отраслей в животноводстве. науч. аналит. обзор. / ФГБНУ «Росинформагротех». – М., 2011. – 96 с.

4. Берестнев Е.В., Петриченко В.Е., Петриченко В.В. Рекомендации по организации и ведению технологического процесса на мукомольных предприятиях. 2-е изд., доп. – М.: ТД ДеЛи, 2020. – 368 с.

Об авторах

Анашкин Николай Николаевич – выпускник кафедры «Машины и аппараты химических производств», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: tocross@yandex.ru.

Портнова Анна Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: annysky2002@mail.ru.

И.И. Анашкина, Е.Н. Анашкина, А.В. Портнова

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ
B. SUBTILIS НА РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ**

В процессе выполнения работы выделена культура *Bacillus subtilis* – продуцента протеолитических ферментов. Подобран оптимальный метод определения протеолитической активности ферментных препаратов в культуральной жидкости. Предложен вариант замены животного белка на растительный в составе питательной среды с целью снижения ее стоимости.

Ключевые слова: ферменты, протеолитическая активность, питательная среда, *Bacillus subtilis*.

I.I. Anashkina, E.N. Anashkina, A.V. Portnova

**IMPROVEMENT OF THE METHOD FOR DETERMINING
THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF ENZYMES PRODUCED
B. SUBTILIS ON DIFFERENT NUTRIENT MEDIA**

In the course of the work, a culture of *Bacillus subtilis*, a producer of proteolytic enzymes, was isolated. The optimal method for determining the proteolytic activity of enzyme preparations in the culture broth was selected. A variant of replacing animal protein with vegetable protein in the composition of the nutrient medium in order to reduce its cost is proposed.

Keywords: enzymes, proteolytic activity, nutrient medium, *Bacillus subtilis*.

В настоящее время животноводческие хозяйства, птицефермы, стараются исключить применение антибиотиков и вводят в состав комбикормов биопрепараты из живых микробных культур, также такие биопрепараты применяются при производстве сухих кормов для домашних животных. Самой доступной и эффективной основой пробиотических препаратов являются спорообразующие бактерии рода *Bacillus*. Споровые пробиотики состоят из споровых микроорганизмов, которые выдерживают кислую среду желудка и, поступая в кишечник, быстро прорастают, вытесняя патогенную микрофлору, повышают усваиваемость кормов, усиливают резистентность организма животных к заболеваниям. При этом сохра-

няют жизнеспособность при приеме антибиотиков, повышенной кислотности, высокой температуре, давлении, когда другие виды микроорганизмов погибают. *Bacillus subtilis* очень удобны в производственном процессе БАДов, кормов, лечебных средств, так как устойчивы к широкому диапазону температур, экологически безопасны, имеют длительный срок хранения [3].

Перспективным направлением в биотехнологии является использование зерновых отходов в качестве субстрата для пробиотических бактерий с получением новых продуктов. Зерновые культуры обладают богатым химическим составом, что способствует накоплению протеазы бактериями *Bacillus subtilis* (табл. 1). Корма на основе зерновых и злаковых компонентов дают возможность включить в рацион питания животных не только пробиотики, но и клетчатку.

Таблица 1

Средний химический состав целого зерна злаковых и бобовых культур (в % от веса сухой массы)

Культура	Белки	Клетчатка	Сахар	Пентозаны и другие углеводы
Пшеница	15	2,8	4,3	8,0
Рожь	13	2,2	5,0	10,0
Овес	12	14,0	2,0	13,0
Соя	39	5,0	10,0	–
Подсолнечный шрот	30-35	19	18	–

Стоимость биопрепаратов во многом зависит от питательных сред, применяемых для культивирования *Bacillus subtilis*, входящих в состав пробиотиков. Состав должен обеспечивать бактерии всеми необходимыми питательными веществами не только для роста и развития, но и для накопления ими протеолитических ферментов.

Для удешевления стоимости проведена оптимизация питательных сред путем замены в средах животного белка на растительный.

В процессе проведения исследования возникает необходимость ежедневно проверять активность протеаз. Предложенный способ определения протеолитической активности – это модифицированный метод Ансона, который подразумевает большие затраты по времени и стоимости [2].

Разработан ускоренный метод на основе патента [1], используемого для подбора оптимального состава разных питательных сред для культивирования *Bacillus subtilis*.

Протеолитическая активность определялась путем нанесения дисков из фильтровальной бумаги, пропитанных ферментным раствором, на застывший молочный агар, с последующей инкубацией в термостате в течение 10–15 ч.

Состав молочного агара: стерильное обезжиренное молоко (20 мл) добавлено в 80 мл расплавленного стерильного 1,5%-ного раствора агара, предварительно остуженного до 50–60 °С [4].

Готовый молочный агар был разлит в чашки Петри по 15–20 мл, после застывания на агар размещены диски фильтровальной бумаги диаметром 10–12 мм, предварительно стерилизованные в сухожаровом шкафу 2 ч при 160 °С. На диски наносили исследуемый ферментный раствор по 25 мкл дозатором. Чашки инкубировались в термостате при 37 °С 10–15 ч. По истечении этого времени на агаре при активном протеолизе проявились прозрачные зоны. По размеру выходящих за диск хорошо выраженных осветленных зон определялась наибольшая активность нейтральной протеиназы (рН = 7...7,5).

Для проведения исследования были взяты три среды с разными источниками азота и углерода (мочевина и сульфат аммония, дрожжевой экстракт, соевая мука). В составе среды I источниками углерода и азота служили казеин, *d*-мальтоза, мочевина, сульфат аммония. В среде II источниками С и N были казеин, глюкоза и дрожжевой экстракт, а в среде III – соевая мука, глюкоза и мочевина.

Культура *Bacillus subtilis*, выделенная из сенного настоя, хранится в холодильнике в пробирках на скошенном агаре, для обновления микроорганизмов пересев производится раз в месяц.

В качестве посевного материала использована 48-часовая культура клеток (объем инокулята составляет 1 % от объема питательной среды). Исследование динамики роста культуры *Bacillus subtilis* выявило, что максимальное увеличение протеолитической активности в культуральной жидкости происходит после 24 ч (выход на стационарную фазу), при 37 °С, интенсивности перемешивания 130 об/мин.

Уровень протеолитической активности определен через 1, 2, 3 и 4 суток в культуральной жидкости, бесклеточном культуральном супернатанте и в очищенном растворе после высаливания фермента сульфатом аммония. Результаты экспериментов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Протеолитическая активность на средах I, II, III

Среда	Время (сутки)	Размер зоны осветления, мм		
		Культуральная жидкость	Супернатант	После высаливания
I	1	28	28	19
	2	32	29	19
	3	35	26	18
	4	35	26	17
II	1	36	35	28
	2	36	35	28
	3	38	35	29
	4	37	35	30
III	1	34	19	19
	2	35	20	19
	3	35	20	20
	4	35	21	22

Как показали исследования, в культуральной жидкости, содержащей бактерии, протеолитическая активность несколько выше, чем в бесклеточной культуральной жидкости. После высаливания фермента активность немного снижается.

При изменении источников азота и углерода протеолитическая активность меняется. Проявление протеолитических свойств в среде I начиналось через 15 ч инкубации, зона просветления меньше, чем в среде II, где протеолиз начинался через 10 ч.

Замена казеина на соевую муку в среде III показала хорошие результаты, сопоставимые с активностью протеолитических ферментов, полученных на средах I и II с казеином.

В дальнейшем планируется полная замена казеина, являющегося источником азота, на растительный белковый субстрат (пивную дробину, подсолнечниковый шрот и пшеничные отруби совместно с мочевиной и сульфатом аммония), что также будет способствовать удешевлению биопрепарата.

Список литературы

1. Способ определения активности протеолитических ферментов: патент 977490 СССР. / Позднякова Л.И. – Заявл. 07.01.1980; опубл. 30.11.1982.

2. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1987. – 335 с.

3. Мамедова Л.В., Лебедев Л.Р. Влияние условий культивирования *Bacillus subtilis* на продукцию протеолитических ферментов // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2016. – № 8–1. – С. 41–44.

4. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

Об авторах

Анашкина Инесса Игоревна – магистрант кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: korolevainessa0@gmail.com.

Анашкина Елена Николаевна – учебный мастер кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: anashkina1964@yandex.ru.

Портнова Анна Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: annysky2002@mail.ru.

К.А. Бабинцев, А.В. Портнова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК БЕЛКОВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОДУКТА, ПОЛУЧЕННОГО С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЕРМЕНТАЦИИ

Представлен анализ передовых исследований в области здравоохранения, демонстрирующий преимущества белков растительного происхождения по сравнению с белками животного происхождения в рационе питания человека. Приведена экспериментальная технология получения растительного продукта на основе сои. Представлены результаты анализов продукта на содержание белка, липидов, титруемой кислотности, наличие плесневых грибов и дрожжей.

Ключевые слова: белковый продукт, молочнокислое брожение, *Lactobacillus acidophilus*, содержание белка, содержание липидов, титруемая кислотность.

K.A. Babintsev, A.V. Portnova

DETERMINATION OF THE MAIN CHARACTERISTICS OF A PROTEIN PLANT PRODUCT PREPARED USING FERMENTATION

Provides an analysis of cutting-edge health research demonstrating the benefits of plant-derived proteins before animal proteins. An experimental technology for obtaining a plant product based on soybeans is presented. The results of product analyzes are presented for: protein content, lipids, titratable acidity, presence of mold and yeast.

Keywords: protein product, lactic acid fermentation, *Lactobacillus acidophilus*, protein content, lipid content, titratable acidity.

Актуальность темы высока в связи с высокой популярностью высокобелковых низкокалорийных растительных продуктов.

Передовые исследования в области здравоохранения демонстрируют преимущества использования в рационе питания человека растительного белка. Дело в том, что большое потребление животного белка провоцирует проблемы со здоровьем.

Высокое потребление животного белка коррелирует со смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний, а высокое потребление растительного белка обратно пропорционально связано со смертностью от всех причин и со смертностью от сердечно-

сосудистых заболеваний, особенно среди лиц, имеющих по крайней мере один фактор риска, связанный с образом жизни [1].

Еще в одном крупном проспективном исследовании более высокое потребление растительного белка было связано с более низкой общей смертностью и смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний. Хотя потребление животного белка не было связано с исходами смертности, замена белка красного мяса или переработанного мясного белка на растительный белок была связана с более низкой общей смертностью, смертностью от рака и от сердечно-сосудистых заболеваний [2].

Соблюдение богатой растительным белком диеты является правильным выбором для пожилых людей, поскольку это может принести пользу здоровью человека и продлить время жизни [3].

В целом, исследования на людях и животных показывают, что диета с низким содержанием белка в среднем возрасте, вероятно, будет полезна для предотвращения рака, общей смертности и, возможно, диабета. Результаты исследования показывают, что диета, в которой питательные вещества растительного происхождения составляют большую часть потребляемой пищи, вероятно, принесет максимальную пользу для здоровья во всех возрастных группах. Также очевидно, что в старшем возрасте предпочтительно переходить к умеренному или высокому потреблению белка, преимущественно на растительной основе, чтобы поддерживать здоровый вес [4].

Анализируя передовые исследования, можно предположить возрастающую популярность белковых продуктов на основе растительного сырья. Очевидным становится преимущество обработанного (частично денатурированного) растительного белка в силу более легкого усвоения. Большое количество белка содержится в бобовых. Например, в соевых бобах 21 мас. % белка. Использование сои перспективно в качестве сырья для белкового продукта. Применение же молочнокислого брожения с использованием *Lactobacillus acidophilus* позволяет частично денатурировать белок, а также наполняет продукт молочной кислотой и симбиотическими микроорганизмами.

В данной работе предложено получение растительного продукта ферментацией соевых бобов ацидофильными лактобактериями. Тестовой культурой служила *Lactobacillus acidophilus*. Условия культивирования следующие: температура 45 °С и время 8 ч.

Технология получения растительного продукта включает в себя ряд последовательных этапов:

- 1) вымачивание бобов в холодной водопроводной воде в течение 12 ч,
- 2) измельчение и гомогенизация бобов,
- 3) водная экстракция из бобовой массы в течение 5 ч (в соотношении 1 л воды на 100 г бобов),
- 4) фильтрация экстрагируемых компонентов с целью удаления твердофазных агрегатов, не подвергшихся дезинтеграции, для получения гомогенного продукта,
- 5) нагрев суспензии до 45 °С и внесение инокулята,
- 6) ферментация,
- 7) удаление избыточной влаги из продукта посредством прессования на тканевом фильтре,
- 8) продукт готов к употреблению.

Данная технология апробировалась на соевых бобах. Консистенция полученного соевого продукта упругая творогообразная. Цвет молочно-белый. Запах растительный. Окраска по Грамму и последующее микрокопирование показали наличие в продукте тестовой культуры *Lactobacillus acidophilus*.

Для определения основных характеристик полученного продукта были проведены следующие анализы: определение массовой доли белка по Кьельдалю, определение массовой доли липидов, определение титруемой кислотности.

Определение азота и белка по Кьельдалю осуществлялось в соответствии с ГОСТ Р 54662–2011, содержание белка составило 29,57 %.

Определение липидов проводилось в соответствии с ГОСТ 8756.21–89 гравиметрическим методом. Количество экстрагированных липидов составило 11,97 %.

Титруемая кислотность сыра составила 24 °Т.

Определение дрожжей и плесневых грибов проводили в соответствии с ГОСТ 10444.12–88. Колоний плесневых грибов и дрожжей в первом разведении не выявлено.

Таким образом, предложена технология получения растительного продукта на основе сои с применением ферментации. Результаты ее применения перспективны в связи с возрастающим спросом на высокобелковую, низкокалорийную растительную продукцию, обладающую пробиотическими свойствами.

Список литературы

1. Association of animal and plant protein intake with all-cause and cause-specific mortality // JAMA Intern Med. – 2016. – Vol. 176(10). – P. 1453–1463. DOI: 10.1001/jamainternmed.2016
2. Association of animal and plant protein intake with all-cause and cause-specific mortality in a Japanese cohort // JAMA Intern Med. – 2019. – Vol. 179(11). – P. 1509–1518. DOI: 10.1001/jamainternmed.2019
3. The association of animal and plant protein with successful ageing: a combined analysis of MEDIS and ATTICA epidemiological studies. – 2020 May 21. – P. 1–10. DOI: 10.1017/S1368980020000427
4. Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. Author manuscript; available in PMC 2015 Mar 4. PMCID: PMC3988204.

Об авторах

Бабинцев Кирилл Алексеевич – студент бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: kirik.bv@bk.ru.

Портнова Анна Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: annsky2002@mail.ru.

Э.Р. Бакиева, А.В. Тищенко, Л.В. Литвиненко

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОК АКТИНОБАКТЕРИЙ

Изучено влияние тяжелых металлов на морфометрические изменения клеток актинобактерий из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов.

Ключевые слова: актинобактерии, загрязнение, тяжелые металлы, морфометрия.

E.R. Bakieva, A.V. Tishchenko, L.V. Litvinenko

INFLUENCE OF HEAVY METALS ON MORPHOMETRIC PARAMETERS OF ACTINOBACTERIA CELLS

The influence of heavy metals on morphometric changes in actinobacterial cells from the Regional profiled collection of alkanotrophic microorganisms (IEGM) was studied.

Keywords: actinobacteria, pollution, heavy metals, morphometry.

Тяжелые металлы (ТМ) являются опасными загрязнителями окружающей среды. Данные загрязнения вызывают изменение организации системы сообществ бактерий, приводят к ухудшению общего видового биоразнообразия, а также к преобладанию видов, устойчивых к ТМ, относительно исходных сообществ, не загрязненных ТМ.

Под воздействием ионов ТМ в клетках бактерий можно наблюдать протекание различные изменений, которые в первую очередь связаны с их морфологическими особенностями. Известно, что небольшие концентрации ТМ могут ускорять метаболические процессы, а также усиливать развитие клеток бактерий, но большие дозы тех же самых металлов оказывают токсическое действие на клетки. Действие металлов на разные виды микроорганизмов отличается и является индивидуальным. В связи с этим необходимо учитывать существующие и опасные концентрации металлов.

Проявление токсичного действия ТМ на бактериальные клетки может быть различно, оно зависит от физико-химических свойств металла (размеров атома, степени их окисления и от того, с каким

соединением связаны ионы ТМ) [1, 3]. Иногда в начале процесса культивирования рост клеток затормаживается, но спустя некоторое время скорость роста бактериальных клеток и конечная биомасса доходят до уровня, который аналогичен росту клеток при культивировании в среде, не загрязненной ионами ТМ. Также возможны случаи, когда динамика начального роста сохраняется, тогда как скорость роста и биомасса ниже, чем в незагрязненной среде [2].

Материалы и методы

В работе исследовали три штамма актинобактерий (www.iegml.ru/iegmlcol, номер УНУ 73559): *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 70^T, *R. ruber* ИЭГМ 91, *R. ruber* ИЭГМ 455. Клетки актинобактерий выращивали на орбитальном шейкере (160 об/мин, 24 ч) в мясопептонном бульоне (МПБ) или жидкой минеральной среде Rhodo (У/в) с добавлением *n*-гексадекана (3 об. %) в качестве единственного источника углерода в условиях загрязнения среды культивирования ТМ. В работе использовали следующие соли ТМ: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cd} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2CrO_4 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в концентрациях 1,25 и 5,0 мМ. В качестве контроля (К) выступали питательные среды с бактериальными культурами без добавления ТМ. Для анализа отбирали пробы через 1, 3, 24 ч культивирования.



Рис. 1. Клетки *R. ruber* ИЭГМ 70^T в условиях загрязнения МПБ Ni^{2+} (1,25 мМ) через 24 ч культивирования

Морфометрический анализ исследуемых клеток проводили путем микроскопирования на фазово-контрастном световом микроскопе Axiostar plus (Carl Zeiss). Морфометрические показатели анализировали с помощью пакета компьютерных программ «Видео-ТестТ». Проводили измерение длины и ширины бактериальных клеток, межклеточных углов, а также измерения площади клеточных конгломератов (рис. 1).

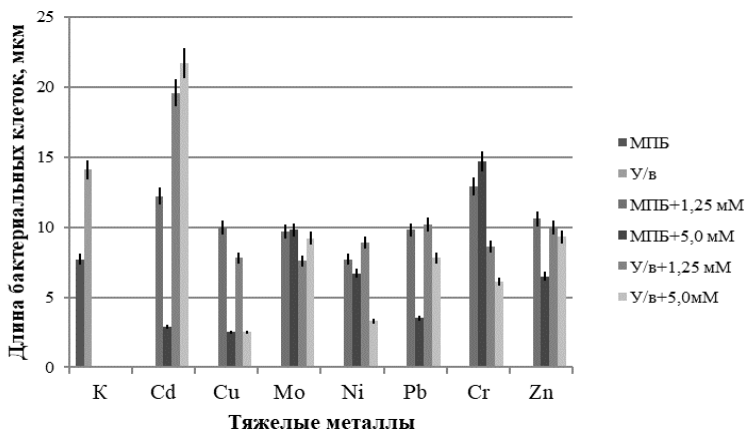


Рис. 2. Влияние ТМ на длину клеток *R. ruber* ИЭГМ 70^Т

Результаты исследования

Установлено, что культивирование актинобактерий в средах, загрязненных ТМ, приводит к изменению (уменьшению или увеличению) размеров бактериальных клеток. Так, при изучении морфометрических параметров *R. ruber* ИЭГМ 70^Т увеличение длины бактериальных клеток (до 10 мкм) происходит в условиях загрязнения среды культивирования ионами кадмия и хрома, тогда как загрязнение среды ионами Cu^{2+} , Mo^{6+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} и Zn^{2+} приводит к уменьшению длины клеток родококков до 2 мкм (рис. 2).

При культивировании клеток *R. ruber* ИЭГМ 91 (рис. 3) в условиях загрязнения среды Mo^{6+} и Pb^{2+} наблюдалось увеличение длины клеток родококков до 30 мкм, тогда как ионы Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} оказывали негативное влияние и приводили к уменьшению длины бактериальных клеток до 3 мкм.

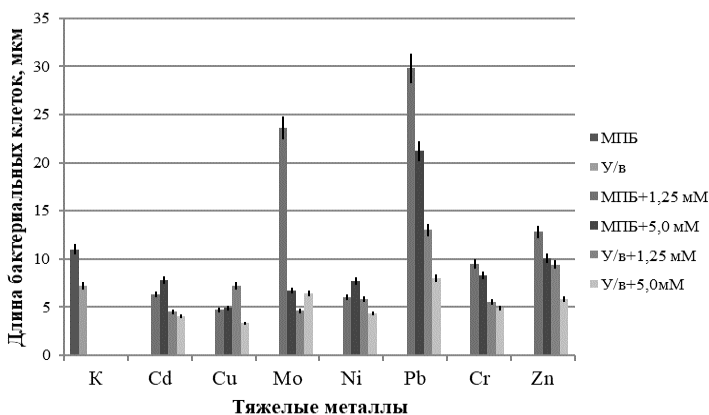


Рис. 3. Влияние ТМ на длину клеток *R. ruber* ИЭГМ 91

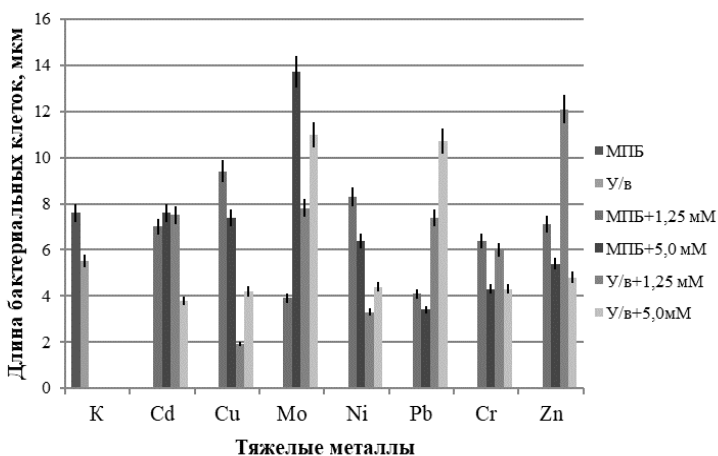


Рис. 4. Влияние ТМ на длину клеток *R. ruber* ИЭГМ 455

При исследовании клеток *R. ruber* ИЭГМ 455 замечено (рис. 4), что максимальное уменьшение длины клеток наблюдалось в условиях загрязнения среды культивирования медью, никелем и свинцом, что говорит о подавлении роста клеток *R. ruber* ИЭГМ 455 данными металлами.

Практически во всех вариантах эксперимента наблюдалось незначительное увеличение ширины бактериальных клеток; так,

максимальное (до 2 раз) увеличение зафиксировано в условиях загрязнения сред ионами цинка и кадмия.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Исследование материалов и веществ» ПФИЦ УрО РАН. Исследования выполнены в рамках государственного задания (AAAA-A19-119112290008-4) и при финансовой поддержке правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/174.1.

Список литературы

1. Багаева Т.В., Ионова Н.Э., Надеева Г.В. Микробиологическая ремедиация природных систем от тяжелых металлов: учеб.-метод. пособие / Казан. ун-т. – Казань, 2013. – 56 с.
2. Богачева А.С. Чувствительность цианобактерий к токсическому действию солей тяжелых металлов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – СПб., 2011. – 139 с.
3. Костина Л.В. Аккумуляция солей тяжелых металлов клетками актинобактерий и использование *Rhodococcus*-биосурфактантов для мобилизации и извлечения тяжелых металлов из нефтезагрязненной почвы. Пермь, 2010. – С. 8–14.

Об авторах

Бакиева Эльмира Рашидовна – магистрант кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: barel03@mail.ru.

Тищенко Артем Валерьевич – аспирант, Пермский государственный национальный исследовательский университет, e-mail: arty.tishchenko@gmail.com.

Литвиненко Людмила Викторовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, e-mail: lkostina@list.ru.

**А.А. Балужева, Д.А. Веретенникова, А.С. Олькова,
Е.И. Ивашкина, Е.В. Баньковская, А.В. Кудинов, Д.В. Першин**

ПРИРОДНЫЕ УГЛЕВОДОРОДЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

Исследована противовоспалительная активность мазевых композиций, содержащих прямогонные бензиновые фракции. Методом газодсорбционной хроматографии определен групповой химический состав и рентгено-флуоресцентным методом на приборе ElvaX определено содержание серы. Выявлена корреляционная зависимость противовоспалительной активности от содержания серы, парафинов, нафтенных и ароматических.

Ключевые слова: прямогонный бензин, корреляционное уравнение, противовоспалительная активность.

**A.A. Balueva, D.A. Veretennikova, A.S. Olkova,
E.I. Ivashkina, E.V. Bankovskaya, A.V. Kudinov, D.V. Pershin**

NATURAL HYDROCARBONS PERSPECTIVE – MEDICAL PRODUCTS

The work investigated the anti-inflammatory activity of ointment compositions containing straight-run gasoline fractions. The group chemical composition was determined by gas-adsorption chromatography, and the sulfur content was determined by the X-ray fluorescence method on an ElvaX device. The correlation dependence of anti-inflammatory activity on the content of sulfur, paraffins, naphthenes and aromatics was revealed.

Keywords: straight-run gasoline, correlation equation, anti-inflammatory activity.

Нафталанская нефть применялась для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата, кожи (псориаз, экзема, дерматит), болезней сосудов. Этот вид нефти по своему составу, структуре и лечебным свойствам отличается от других нефтей [1]. Сейчас извлекаемые запасы этого месторождения почти выработаны. Ввиду этого поиск новых биологически активных фракций нефти является актуальной задачей фармакологии.

Цель данной работы – оценка перспективы использования прямогонных бензиновых фракций в ветеринарии или медицине.

Объект исследования – прямогонный бензин с установки АВТ-5 предприятия «ЛУКОЙЛ-Пермнефтеоргсинтез», который в лаборатории был разделен фракционной перегонкой на пять узких фракций.

Химический состав каждой бензиновой фракции определяли методом газо-адсорбционной хроматографии на приборе Agilent 7890В. Обработку результатов хроматографирования проводили с помощью программного обеспечения DNA+. Содержание серы в каждой прямогонной бензиновой фракции определяли рентгенофлуоресцентным методом на анализаторе ElvaX.

Суммарное количественное содержание аренов, нафтенов, парафинов, изопарафинов, а также концентрация серы во всех бензиновых фракциях приведены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты определения группового углеводородного состава и содержания серы в прямогонных бензиновых фракциях

Фракция	Элементный состав, мас. %	Групповой углеводородный состав, мас. %			
	Сера	Арены	Нафтены	Парафины	Изопарафины
АВТ-5	0,019	29,4	21,8	3,4	37,7
АВТ-5-38-60	0,012	1,1	7,7	42,6	43,7
АВТ-5-60-95	0,012	1,7	14,2	36,5	42,4
АВТ-5-95-122	0,011	1,3	31,0	25,5	34,9
АВТ-5-122-150	0,016	3,7	30,0	24,1	33,7
АВТ-5-150-176	0,037	11,9	12,7	23,4	38,7

Из табл. 1 видно, что во фракции АВТ-5-150-176 содержится наибольшее количество аренов. Нафтеносодержащие углеводороды преобладают во фракциях АВТ-5-95-122 и АВТ-5-122-150, а парафиновые и изопарафиновые – во фракции АВТ-5-38-60. С увеличением температуры кипения фракции увеличивается концентрация серы.

Изучение противовоспалительной активности (ПВА) проведено на белых нелинейных крысах [2] на модели острого воспалительного отека, вызванного введением 0,1 мл 1%-ного водного раствора каррагинина [3].

Результаты изучения противовоспалительной активности прямогонных бензиновых фракций представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Противовоспалительная активность мазевых композиций
на основе прямогонных бензиновых фракций нефти**

Объект исследования	Объем стопы до введения флогогена, мл	Объем стопы через 3 ч, мл	Процент прироста объема стопы через 3 ч	Торможение отека через 3 часа, %	
				По сравнению с контролем	По сравнению с основой (I)
АВТ-5	1,12±0,03	1,65±0,05	47,62±1,45	30,56	—
АВТ-5-38-60	1,17±0,03	1,43±0,05	22,21±2,03***	67,61	54,27
АВТ-5-60-95	1,41±0,05	2,02±0,12	43,73±7,14*	34,21	9,9
АВТ-5-95-122	1,26±0,02	1,51±0,04	19,97±3,43***	70,88	58,9
АВТ-5-122-150	1,66±0,06	2,08±0,08	25,24±1,09***	62,03	48,0
АВТ-5-150-176	1,76±0,05	2,07±0,04	17,63±2,22***	73,48	63,7
Основа	1,48±0,07	2,09±0,03	48,57±4,16	26,92	—
Контроль	1,24±0,06	2,09±0,11	68,58±1,43	—	—

Примечания: * – различие достоверно по сравнению с контролем при $p < 0,05$; ** – различие достоверно по сравнению с основой при $p < 0,05$.

Для количественной оценки действия бензиновых фракций использовали величину V – торможение отека через 3 ч по сравнению с основой.

Из табл. 2 видно, что мазевая основа не проявляет противовоспалительной активности на модели асептического каррагенинового воспаления.

Композиции АВТ-5-38-60, АВТ-5-95-122, АВТ-5-122-150 и АВТ-5-150-176 оказывают значительное противовоспалительное действие, уменьшая выраженность воспалительного отека по сравнению с мазевой основой на 48,0–63,7 %.

Корреляционная зависимость ПВА от содержания серы прямогонных бензиновых фракций была проведена с помощью программы Excel ($n = 5$). Полученные уравнения представлены в табл. 3.

В ходе данной работы выявлены качественная и количественная зависимости между физико-химическими свойствами бензиновых фракций. На основании проведенных исследований сделаны следующие выводы:

1. Прямогонные бензиновые фракции проявляют высокую противовоспалительную активность.

Таблица 3

Линейные и нелинейные модели зависимости
«химический состав – активность»

Уравнение корреляции	r	R^2
$V = 0,0457C_{\text{п}}^3 - 4,1203C_{\text{п}}^2 + 118,2C_{\text{п}} - 1037,7$	0,9606	0,9227
$V = 0,6421C_{\text{н}}^3 - 74,811C_{\text{н}}^2 + 2890C_{\text{н}} - 36964$	0,8235	0,6781
$V = 0,0545C_{\text{н}}^3 - 2,6158C_{\text{н}}^2 + 32,933C_{\text{н}} - 66,058$	0,6693	0,4479
$V = -3,657C_{\text{а}}^3 + 62,212C_{\text{а}}^2 - 237,6C_{\text{а}} + 257,81$	0,9178	0,8423
$V = 2 \cdot 10^8 S^3 + 2 \cdot 10^7 S^2 - 289389S + 1677,6$	0,6842	0,4681

Примечание: $C_{\text{п}}$ – концентрация парафинов, $C_{\text{н}}$ – концентрация изопарафинов, $C_{\text{н}}$ – концентрация нафенов, $C_{\text{а}}$ – концентрация аренов, S – концентрация серы.

2. Наибольшее противовоспалительное действие выявлено у мазевых композиций на основе фракций АВТ-5-95-122 и АВТ-5-150-176. Рекомендуются для дальнейших углубленных исследований.

Полученные результаты могут успешно использоваться на практике.

Список литературы

1. Мурадов А.Н. Синтез биологически активных веществ на основе лечебной нафталанской нефти // Инновации в современной науке. – 2014. – С. 169–173.
2. Биологическая активность компонентов нефти // Химия. Экология. Урбанистика.: материалы всерос. науч.-практ. конф. (с междунар. участием), г. Пермь, 23-24 апр. 2020 г. /Е.И. Ивашкина, Г.Е. Ваньков, Е.В. Баньковская, А.В. Кудинов / Перм. нац. иссл. политехн. ун-т. – Пермь, 2020. – Т. 2. – С. 79–83.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

Об авторах

Балуева Анна Андреевна – студентка, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: balueva278@gmail.com.

Веретенникова Дарья Александровна – студентка, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: dashveretennikova@mail.ru.

Олькова Алина Сергеевна – студентка, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: alinaolkova03@gmail.com.

Ивашкина Екатерина Ивановна – студентка, Пермская государственная фармацевтическая академия, e-mail: ekaterina.ivashkina@lenta.ru.

Баньковская Екатерина Владимировна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры «Химические технологии», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: albit2302@mail.ru.

Кудинов Андрей Викторович – старший преподаватель кафедры «Химические технологии», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: kav_ttum@mail.ru.

Першин Даниэль Владимирович – ассистент кафедры «Химические технологии», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: daniel-pershin@mail.ru.

А.М. Баранова, Я.В. Лобанова

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ КСЕНОБИОТИКОВ

Описано определение метаболизма, рассмотрены его стадии и главные ферменты, которые трансформируют ксенобиотики. Приведены методики по получению фракции S9, по изучению метаболизма органических соединений с использованием данной фракции и методика оценки радикалсвязывающей активности в тесте окислительного гемолиза эритроцитов. Представлены результаты экспериментов по данным методикам.

Ключевые слова: метаболизм ксенобиотиков, фракция S9, цитохромы P450.

A.M. Baranova, Ya.V. Lobanova

STUDY OF METABOLIC STABILITY OF XENOBIOTICS

Metabolism, its phases, and the main enzymes that transform xenobiotics are described. Methods of obtaining the S9 fraction, for study of organic compounds metabolism applying this fraction, and evaluating of the radical-binding activity in the test of oxidative hemolysis of erythrocytes are described. The results of experiments on these methods are presented.

Keywords: metabolism of xenobiotics, S9 fraction, cytochromes P450.

При взаимодействии с окружающей средой люди и животные часто подвергаются воздействию чужеродных для организма соединений. Далее эти вещества поступают в организм человека, преодолевая биологические барьеры. В конце их «пути» они приходят через кровоток в печень, где происходит их трансформация в результате реакций метаболизма. Данные реакции приводят к значительным изменениям структуры веществ и их свойств, включая токсичность. Именно поэтому одним из важных аспектов изучения веществ, поступающих в организм человека, является изучение реакций его метаболизма [1].

В метаболизме выделяют 2 фазы. Реакции фазы I отвечают за образование новых функциональных групп в молекуле ксенобиотика. Это помогает увеличить его полярность, т.е. создать «места» в молекуле, способные к конъюгации. Фаза I метаболизма включает в себя химические реакции, такие как окисление (наиболее рас-

пространенные), восстановление и гидролиз. Метаболизм фазы II включает в себя реакции, которые химически изменяют препарат или метаболиты, образовавшиеся в фазе I. Полученные соединения достаточно растворимы, чтобы выводиться с жидкостями из организма. В этих реакциях молекула ксенобиотика или его метаболита присоединяется к ионизируемой группе. Этот процесс называется конъюгацией [2, 3].

Большую роль в биотрансформации ксенобиотиков играет система цитохрома. Цитохром P450 – это большое семейство ферментов, которые встречаются как в прокариотических, так и в эукариотических организмах. В настоящее время известно более тысячи изоферментов цитохрома P450, подразделяемых на семейства и подсемейства. В организме человека содержится около 30 CYP ферментов, которые участвуют в метаболизме. Однако 90 % окисления лекарственных средств связано с шестью основными ферментами: CYP 2D6, 2C9, 1A2, 2C19, 2E1 и 3A4 [3].

Наибольшее количество лекарственных препаратов метаболизируется при участии CYP3A4. При этом в большинстве случаев под действием данного изофермента вещества превращаются в неактивные гидрофильные метаболиты, которые легко «отфильтровываются» в почках и выводятся [4].

Не менее важный изофермент – CYP2E1. Это фермент, который особенно активно участвует в метаболизме эндогенных субстратов. CYP2E1 также может активировать токсичные соединения и прокарциногены, содержащиеся в табачном дыме и нитрозаминных соединениях, также CYP2E1 играет важную роль в микросомальной системе окисления этанола (MEOS). После хронического потребления этанола активность MEOS повышается, что связано с повышением уровня цитохрома P450, особенно CYP2E1, и пролиферацией гладкого эндоплазматического ретикулума [5].

Замечено, что активация CYP2E1 сопровождается образованием большого количества активных форм кислорода, вносящих существенный вклад в развитие окислительного стресса и воспаления. Чтобы компенсировать этот дисбаланс, организм может использовать вещества, обладающие радикалсвязывающими свойствами, способные подключаться к антиоксидантной системе, влияя на скорость и направление трансформации как собственно индуктора, так и одновременно с ним поступивших в организм ксенобиотиков. Таким образом, растет интерес к оценке радикалсвязываю-

щей активности исследуемых веществ, так как она может дать дополнительную полезную информацию для предсказания влияния самих веществ и их метаболитов на целостный организм.

Для оценки радикалсвязывающего действия использовали тест, основанный на моделировании разрушения мембраны эритроцита в условиях окислительного стресса. В качестве источников свободных радикалов использовали 2,2'-азобис (2-метилпропионамидин) дигидрохлорид (AAPH) и оценивали способность исследуемого вещества предотвращать разрушение мембраны эритроцитов крови крыс радикалом. Исследовали препарат «Верапамил», являющийся субстратом изофермента CYP2E1, и экспериментальное вещество ЯК-3, в качестве эталонного соединения использовали кверцетин. Вещества в концентрациях 200, 10 и 5 мкМ инкубировались с 5%-ной суспензией эритроцитов, подвергнутой окислительному стрессу, вызванному AAPH. После инкубации измеряли оптическую плотность при 540 нм (поглощение гемоглобина) и рассчитывали радикалсвязывающее действие.

Верапамил и ЯК-3 во всех исследуемых концентрациях не обладают радикалсвязывающим действием, поскольку не защищают клетки эритроцитов.

Для оценки метаболической стабильности лекарственных средств применяются *in vitro* тест-системы с использованием моделей печени на основе клеток гепатоцитов (клеток печени), а также моделей на основе субклеточного материала, к которому относят микросомы и фракцию S9. S9 – надосадочная жидкость, полученная при дифференциальном центрифугировании при 9000g гомогената печени [6].

Фракция S9, получаемая из печени различных видов млекопитающих, широко используется как средство для оценки аспектов метаболизма новых химических соединений, включающих предсказание клиренса, возможных метаболитов, идентификацию цитохромов, отвечающих за метаболизм исследуемого препарата [6].

В полученную фракцию S9 добавляли исследуемое вещество и раствор $MgCl_2$. Пробы инкубировали при 37 °C 2 мин, вносили растворы NADPH, GSH. Инкубировали готовые пробы, отбирая аликвоты через каждые 30 мин, начиная с $t = 0$. К отобранным пробам добавляли холодный ацетонитрил для остановки реакции и осаждения ферментов. Центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость, которую анализировали с использованием аналитической ВЭЖХ-системы Shimadzu Prominence XR. В докладе будет представлен анализ полученных результатов.

Список литературы

1. Kerns EH, Di L. Pharmaceutical profiling in drug discovery // Drug Discov Today. – 2003. – № 8. – С. 316.
2. Белоусов Ю.Б., Леонова М.В. Введение в клиническую фармакологию. – М.: Мед. информагентство, 2002. – 95 с.
3. Palmer M. Human metabolism lecture notes / Department of Chemistry University of Waterloo. – Canada: MD, 2019. – 434 с.
4. Оценка активности изофермента цитохрома P450 3A4 (CYP3A4) как реальная возможность персонализации фармакотерапии / В. Кукес [и др.] // Врач. – 2008. – № 3. – С. 13–19.
5. The Role of CYP2E1 in the drug metabolism or bioactivation in the brain / W.A. García-Suástegui, L.A. Ramos-Chávez, M. Rubio-Osornio, M. Calvillo-Velasco, J.A. Atzin-Méndez, J. Guevara, D. Silva-Adaya // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2017.
6. Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М. Модель биотрансформации ксенобиотиков in vitro: действие фракции печени S9 на токсичность ряда противовирусных препаратов // Токсикологический вестник. – 2008. – С. 35.
7. Snyder liver S9 fraction-derived metabolites of curcumin analogue UBS109 / Terry W. Moore, Shijun Zhu, Ryan Randolph, Mamoru Shoji, P. James // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2014. – № 5 (4). – С. 288–292.

Об авторах

Баранова Анастасия Михайловна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: brnastasi.25@mail.ru.

Лобанова Яна Викторовна – младший научный сотрудник лаборатории рационального природопользования и природоподобных технологий, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: lobanich.i@gmail.ru.

Научный руководитель – Красных Ольга Петровна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: ol.krasnykh@pstu.ru.

И.С. Безматерных, Л.В. Волкова

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО
ГИДРОЛИЗА НА ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНОЙ СУБСТАНЦИИ ИЗ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ
ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ**

Проведена оценка возможности использования осадка «Б» для получения препарата, обладающего биологически активными свойствами. Предложен ферментативный гидролиз побочных продуктов фракционирования иммуноглобулин содержащих фракций.

Ключевые слова: осадок «Б», биологически активная субстанция, ферментативный гидролиз.

I.S. Bezmaternykh, L.V. Volkova

**STUDY OF THE EFFECT OF ENZYMATIC HYDROLYSIS
ON THE PRODUCTION OF A BIOLOGICALLY ACTIVE
SUBSTANCE FROM THE BY-PRODUCTS OF THE FRACTIONATION
OF IMMUNOGLOBULINS**

The possibility of using sediment "B" to obtain a drug with biologically active properties was evaluated. The enzymatic hydrolysis of the by-products of the fractionation of immunoglobulin-containing fractions is proposed.

Keywords: sediment B, biologically active substance, enzymatic hydrolysis.

Актуальность проблемы

На сегодняшний день переработка побочных продуктов на биотехнологических предприятиях, занимающихся иммунобиологическим производством, является актуальной в связи с использованием такого дорогостоящего сырья как донорская плазма. Для того чтобы отходы таких предприятий не попадали в окружающую среду и не вызвали экологические проблемы, необходимо разрабатывать методы их переработки и создать на их основе препараты, обладающие широким спектром действия.

Существующие иммуноглобулиновые препараты, например противостафилококковый препарат «Стафилолейкин», созданы с по-

мощью сложных и длительных методов. Данные продукты являются достаточно дорогими [1], поэтому с целью совершенствования процесса были предприняты попытки оптимизировать технологию получения продукта, обладающего биологически активными свойствами.

Одним из самых распространенных методов получения препаратов является ферментативный гидролиз побочных продуктов плазмы крови человека. Он предполагает гидролиз белковой молекулы с образованием пептидных фрагментов. Данный вид гидролиза проходит в более мягких условиях, чем, например, при кислотном; ферменты не требуют высоких температур. Стоит отметить, что при ферментативном гидролизе отсутствуют или сведены к минимуму побочные нежелательные продукты и нет необходимости дополнительных стадий очистки, которые являются длительными и дорогостоящими [4]. Под действием протеолитических ферментов расщепляют молекулы иммуноглобулинов на Fab- и Fc-фрагменты. При этом под воздействием разных протеаз можно получить различные продукты. При расщеплении молекулы иммуноглобулина пепсином образуется двухвалентный F(ab)2 – фрагмент, который в изолированном состоянии сохраняет способность связывать антиген.

Имуноглобулиновые препараты, полученные в результате ферментативного гидролиза побочных продуктов иммунобиологических производств, широко используются во многих сферах производственной деятельности. Например, в медицине они используются для лечения иммунодефицитных заболеваний; в биотехнологии – как источник аминокислот и пептидов в культуральных питательных средах; в косметологии – как основные составляющие косметических препаратов [1, 3, 5].

Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности разработки технологии получения биологически активной субстанции из побочных продуктов фракционирования иммуноглобулинов.

Цели исследования: разработка технологии получения и оценка физико-химических свойств биологически активной субстанции из побочных продуктов фракционирования иммуноглобулинов.

Задачи исследования:

- 1) оценить возможность использования осадка «Б» для получения препарата, обладающего биологически активными свойствами;
- 2) предложить ферментативный гидролиз побочных продуктов плазмы крови человека в качестве метода получения препарата, обладающего биологически активными свойствами;

3) провести анализ влияния ферментативного гидролиза на белковый осадок фракционирования иммуноглобулинов;

4) изучить физико-химические свойства полученного пептидного комплекса.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлся осадок фракции «Б», побочный продукт производства иммуноглобулинов.

Для оценки физико-химических свойств полученной белковой субстанции проводили ряд качественных реакций, а именно качественную реакцию с трихлоруксусной кислотой на присутствие в среде высокомолекулярных белковых соединений, биуретовую реакцию на наличие пептидных связей в пробе, реакцию Фолина на наличие ароматических аминокислот и реакцию Шульце – Распайля на наличие в пробе остатков триптофана [2].

Результаты и обсуждение исследования

Для проведения процесса гидролиза осадок «Б» предварительно суспендировали растворителем в соотношении 1:10 с целью максимального выхода белков из осадка. В качестве растворителя использовали 0,05М ацетатный буферный раствор с добавлением 0,04М NaCl. Полученную суспензию центрифугировали в течение 30 мин при 4000 об/мин при температуре 15 °С, отделившийся осадок утилизировали. Супернатант использовали для проведения ферментативного гидролиза под действием пепсина.

Супернатант доводили до pH, при котором наблюдали максимум ферментативной активности, для пепсина оптимальной pH соответствует значениям 1,5–2,0. Белковую суспензию закисляли 0,1М и 0,01М соляной кислотой до значения pH = 1,9, исходное значение pH составляло 1,4.

Приготовленную суспензию разливали по 20 мл в конические колбы вместимостью 50 мл. Далее вносили свежеприготовленный раствор фермента с концентрацией 10 мг/мл пепсина согласно таблице.

С целью учета автогидролиза собственных молекул фермента использовали контрольную пробу: раствор фермента с концентрацией 10 мг/мл и pH = 4,4 без добавления белковой суспензии.

Приготовление сред для ферментативного гидролиза

Номер пробы	Фермент	Концентрация фермента, мг/мл	Объем раствора с ферментом, мл	Значение рН
1	Пепсин	1,0	2,0	1,896
2	Пепсин	1,5	3,0	1,896
3	Пепсин	2,0	4,0	1,896

Смесь инкубировали при температуре 37 °С в течение 72 ч. В процессе гидролиза измеряли рН через каждые 24 ч инкубации. Результаты изменения рН представлены на рисунке.

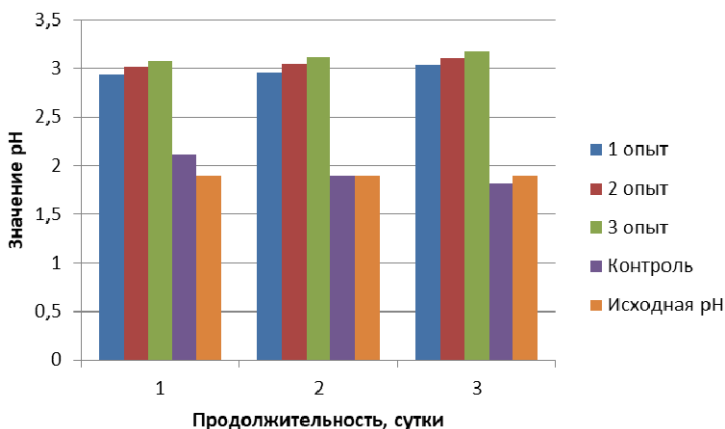


Рис. Изменение значения рН в растворе с пепсином

По результатам исследования видно, что значение рН резко изменилось в течение первых суток испытания, так как соляная кислота участвовала в активации пепсиногена за счет изменения его конформации. При такой конформации раскрывается активный центр фермента, который способен отщеплять блокирующий работу фермента N-концевой фрагмент. В результате аутокатализа активные молекулы пепсина приводят в действие и другие молекулы пепсиногена. Таким образом, в течение первых суток испытания и при концентрации пепсина 1,0 мг/мл ферментативный гидролиз идет наиболее эффективно. На вторые и третьи сутки испытания величина рН изменялась незначительно, но при этом выходила за пределы оптимальной работы фермента. Та же картина присутст-

вовала уже в первые сутки испытания при концентрациях фермента 1,5 и 2,0 мг/мл. Это может свидетельствовать о том, что работа фермента замедлялась.

Таким образом, можно заключить, что для получения гидролизата с высокой степенью расщепления белка наиболее оптимальными условиями для гидролиза будут считаться: 24 ч, концентрация пепсина 1,0 мг/мл, рН = 1,9 и температура 20–22 °С.

После выполнения ферментативного гидролиза проводили реакцию с трихлоруксусной кислотой (ТХУ) на присутствие в среде высокомолекулярных белковых соединений. В пробах изменений не наблюдали, что свидетельствует об отсутствии высокомолекулярных белковых соединений в среде.

Были проведены качественные реакции на белки, в результате которых можно сделать вывод о том, что после ферментативного гидролиза белков осадка «Б» в пробе остались пептиды, содержащие ароматические кислоты и остатки триптофана.

Полученный продукт содержал в себе молекулы иммуноглобулинов, поскольку являлся побочным продуктом иммуноглобулинового производства. Переработка такого высокобелкового сырья методом ферментативного гидролиза позволит почти полностью выделить ценные белки из донорской плазмы и тем самым получить препарат, обладающий биологически активными свойствами.

Заключение

1. Выполнен ферментативный гидролиз при варьировании концентрации пепсина и продолжительности процесса. Подобраны оптимальные условия гидролиза: 24 ч с концентрацией пепсина 1,0 мг/мл.

2. Была проведена оценка физико-химических свойств полученной биологически активной субстанции (БАС).

3. Проведена оценка возможности использования осадка «Б» для получения препарата, обладающего биологически активными свойствами.

Список литературы

1. Афанасьева Т.М. Противостафилококковый препарат «Стафилолейкин»: технология, иммунобиологическая характеристика: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – М., 2017. – 22 с.

2. Биохимия: лаб. практикум. / Сост. В.В. Сенчук, С.И. Мохорева, Н.М. Орел [и др.]; БГУ. – Минск, 2004. – 77 с.

3. Зорин С.Н. Ферментативные гидролизаты пищевых белков для специализированных пищевых продуктов диетического (лечебного и профилактического) питания // Вопросы питания. – 2019. – № 3. – С. 23–31.

4. Максимюк Н.Н., Марьяновская Ю.В. О преимуществах ферментативного способа получения белковых гидролизатов // Фундаментальные исследования. – 2009. – № 1. – С. 34–35. – URL: <http://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=1694> (дата обращения: 04.03.2021).

5. Мальгина Д.Ю. Разработка технологии гемодеривата из отхода производства интерферона и перспективы его использования: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – М., 2014. – 21 с.

Об авторах

Безматерных Ирина Сергеевна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: irka.bezmaternykh00@inbox.ru.

Волкова Лариса Владимировна – доктор медицинских наук, профессор кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: wolkowalw@mail.ru.

**В.А. Васильева, Н.С. Евдокимов,
В.Р. Сафиулова, А.А. Фомичева**

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ *CHLORELLA VULGARIS*

Проведен анализ научно-технических данных по способам накопления биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* и систематизированы их основные результаты. Показаны основные направления и перспективы использования альгомассы в качестве сырья в различных отраслях промышленности.

Ключевые слова: микроводоросли, *Chlorella vulgaris*, биомасса, рациональные условия, азотное питание, условия культивирования.

**V.A. Vasilyeva, N.S. Evdokimov,
V.R. Safiulova, A.A. Fomicheva**

BIOTECHNOLOGICAL DIRECTIONS FOR USE *CHLORELLA VULGARIS*

The analysis of scientific and technical data on the methods of biomass accumulation of the microalgae *Chlorella vulgaris* is carried out and their main results are systematized. The view of using algomass as a raw material in various industries is carried out.

Keywords: microalgae, *Chlorella vulgaris*, biomass, rational conditions, nitrogen nutrition, cultivation conditions.

Изучение микроводоросли *Chlorella vulgaris* в настоящее время вызывает достаточно большой интерес с практической точки зрения. В современном мире этот биообъект используется в ряде перспективных биотехнологических процессов: от получения биомассы до синтеза целевых метаболитов и очистки сточных вод [1]. Так, например, в последнее время из-за сокращения запасов энергетического сырья микроводоросли, в том числе и *Chlorella*, стали перспективным альтернативным углеводородным сырьем с существенными преимуществами и огромным потенциалом [2].

Chlorella vulgaris способна в определенных условиях к накоплению в своем составе компонентов смесового биодизельного топлива – нейтральных липидов, поэтому их используют в производстве

биодизеля [2]. *Chlorella vulgaris* является одним из наиболее часто используемых микроорганизмов для обработки жидких бытовых и промышленных стоков. Также *Chlorella vulgaris* выступает в качестве сырья при производстве кормового белка: после обработки биомасса используется в качестве добавки в рационы скота. Также эти микроводоросли применяют при получении резиноидов – душистых фиксаторов, используемых как красители для пищевых, парфюмерных, косметических продуктов и товаров бытовой химии [3].

Микроводоросль *Chlorella vulgaris* – микроскопический фотосинтезирующий одноклеточный микроорганизм. На данный момент он наиболее изучен из всего рода *Chlorella*, является элементом биопланктона и способен существовать, находясь в симбиотической связи с живыми микроорганизмами. Клетки хлореллы сферические, достигают длины 14 мкм и ширины 8 мкм. Клеточная оболочка достаточно тонкая и плотно прилегающая к протопласту, спереди образует слабо выраженный, тупой носик. Также имеет жгутики, равные длине клетки или слегка превышающие ее. Особенности строения можно считать: пластичный хлоропласт пиреноид в утолщении хлоропласта, и большие вакуоли, в которых могут накапливаться растворенные питательные вещества. Размножаются делением [3].

В своем химическом составе *Chlorella vulgaris* имеет: белки, жиры, микро- и макроэлементы, антиоксиданты, витамины, спорополленин.

Для нормального развития данным микроводорослям необходимы свет, вода, углекислый газ и минеральные вещества. При отклонении условий от оптимальных клетки могут приостановить свой рост и развитие, а затем перейти в покоящееся состояние.

Исследователем Д.С. Дворецким с коллегами в 2014 г. проводились опыты по накоплению *Chlorella vulgaris* в стеклянной установке, снабженной барботером для подачи воздушной смеси с содержанием углекислого газа 0,04 %, при освещенности 10,6 кЛк. Были определены технологические режимы роста биомассы микроводоросли подбором компонентов питательной среды, варьированием температуры роста, а также условий стресса, стимулирующих накопление липидов в клетках. Посевной материал с концентрацией клеток $1 \cdot 10^6$ кл/мл вносили в количестве 20 % от общего объема суспензии. На рисунке изображены результаты накопления биомассы на 8-е сутки, по ним можно сделать заключение,

что среда Тамийя при $T = 29\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6,2 \dots 8,0$ обеспечивала больший прирост биомассы *Chlorella vulgaris*, чем среда ТАР ($55 \cdot 10^6$ и $15 \cdot 10^6$ кл/мл соответственно).

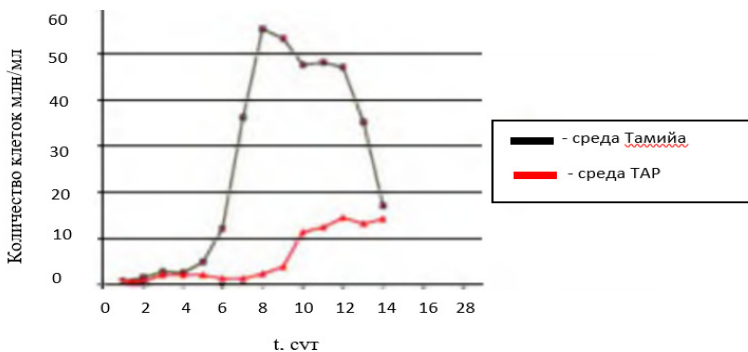


Рис. Накопление биомассы *Chlorella vulgaris* на средах Тамийя и ТАР [4]

В качестве источника азотсодержащих соединений для накопления биомассы штамма *Chlorella vulgaris* ученые выбрали нитрат калия, так как он обеспечивал двукратный прирост биомассы на 7-е сутки культивирования по сравнению со средой с мочевиной и более чем пятидесятикратный – при использовании питательной среды с хлоридом аммония. При этом авторы не рекомендуют накапливать биомассу *Chlorella vulgaris* на средах с пониженным содержанием азота [4].

В 2015 г. исследователи С.А. Нагорнов и Ю.В. Мещерякова также проводили исследования *Chlorella vulgaris* штамма ИФР № С-111, только уже в трубчатом фотобиореакторе. Для начала среду накапливали на чашках Петри со средой Тамийя под освещением люминесцентной лампой в течение 5 суток. По достижении концентрации клеток $5 \cdot 10^6$ кл/мл их постепенно пересеивали в фотобиореактор. Посевной материал для фотобиореактора составлял 25 % от общего объема. Фотопериод составлял: 12 ч с освещенностью 20–25 кЛк, 12 ч темнота, $\text{pH} = 7 \dots 8$, $T = 34 \dots 36\text{ }^{\circ}\text{C}$, также осуществлялась подача углекислого газа 2–10 % и производилось перемешивание суспензии.

Исследования по изучению азотного питания микроводоросли на среде Тамийя с различными концентрациями нитрата калия в рас-

творе показали, что достижение максимальной концентрации микроводорослей происходит быстрее на среде, с увеличенным содержанием азотного компонента, чем на среде обедненной источником азота. При увеличении содержания азотных компонентов в два раза в среде наблюдался прирост биомассы в среднем на 45 %, а при сокращении рост замедлялся. Максимального роста культура достигала при температуре 31 °С. Оптимальная освещенность варьировалась в широких пределах от 0,7 до 20 кЛк, что объясняется способностью *Chlorella vulgaris* к адаптации к различной интенсивности света.

Приемлемая для роста *Chlorella vulgaris* концентрация углекислого газа по разным данным должна составлять от 0,8 до 10 %. Имеются данные, что максимального роста культура достигла при концентрации углекислого газа 4 % [5].

В 2014 г. А.В. Митишев, Е.В. Преснякова и сотрудники проводили сравнительный анализ роста штаммов *Chlorella vulgaris* ИФР С-66, ИФР С-111 и BIN для дальнейшего их использования как сырья для производства резиноидов.

Исследование штамма ИФР № С-111 проводилось в жидкой среде Хогланда при естественном освещении, 15-часовом фотопериоде и $T = 25\text{--}27$ °С. *Chlorella vulgaris* ИФР С-111 достигла своего максимального количества биомассы на 10-е сутки и составила 20 млн кл/мл при плотности исходной суспензии *in vitro* после инокулирования 0,9 млн кл/мл.

Штамм ИФР № С-66 при тех же самых условиях, что и ИФР С-111, достиг максимальной концентрации на 9-е сутки, плотность клеток достигала 10 млн/мл.

И при тех же условиях, что и предыдущие штаммы, *Chlorella vulgaris* BIN на 10-е сутки достиг плотности клеток 22 млн/мл [3].

Сравнительные данные всех рассмотренных выше экспериментов сведены в таблицу.

Таким образом, по результатам проведенных исследователями опытов по накоплению биомассы различных штаммов *Chlorella vulgaris* можно заключить, что максимального роста микроводоросль достигает при следующих условиях: $T = 29\text{--}31$ °С, $pH = 6,0\text{--}8,0$, в присутствии азотных компонентов на 8–10-е сутки.

Проведенный нами сравнительный анализ способов получения биомассы штаммов *Chlorella vulgaris* выявил варьируемые условия внешней среды и закономерности их изменения для накопления альгомассы. Полученные данные помогут рационализиро-

вать исследования по получению биотехнологических продуктов из различных штаммов *Chlorella vulgaris*.

Сравнительные данные экспериментов по накоплению биомассы *Chlorella vulgaris*

№ п/п	Штамм <i>Chlorella vulgaris</i>	Среда культиви- рования и условия накопления	Основные результаты	Источник
1	ИФР № С-111	Среда ТАР, Тамийя, концентрация углекислого газа 0,04 %, барботаж, освещенность 10,6 кЛк	Количество клеток с повышенным содержанием липидов достигается при использовании модифицированной среды Тамийя. Рациональная температура 29,5 °С и pH = 6,2–8,0. Концентрация клеток на 8-е сутки $55 \cdot 10^6$ кл/мл	Д.С. Дворецкий, Е.В. Пешкова, М.С. Темнов, 2014 [4]
2	ИФР № С-111	Среда Тамийя, концентрация углекислого газа 0,8 до 10 %, освещенность 0,7–20·10 ³ Лк	Рациональная температура 31°С и pH=7,0-8,0. Максимальная концентрация клеток наблюдается в присутствии азотных компонентов. Концентрация клеток на 5-е сутки $5 \cdot 10^6$ кл/мл	С.А. Нагорнов и Ю.В. Мещерякова, 2015 [5]
3	ИФР № С-111	Жидкая среда Хог-ланда, 15-часовой фотопериод, температура 25–27 °С	Плотность клеток на 10-е сутки составила 20 млн/мл.	А.В. Митишев, Е.В. Преснякова, Е.Ф. Семенова, М.А. Гурина, 2014 [3]
	ИФР № С-66		Плотность клеток на 9-е сутки составила 10 млн/мл.	
	BIN		Плотность клеток на 10-е сутки 22млн/мл	

Список литературы

1. Chlorella for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green / Wall Panel Biotechnol Biofuels. – 2014. – Vol. 7. – P. 84. DOI: 10.1186/1754-6834-7-84
2. Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: a review / C. Safi [et al.] // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2014. – Vol. 35. – P. 265–278.
3. Сравнительный анализ штаммов продуцента и инновационного продукта как основных элементов биотехнологии резиноида хлореллы / А.В. Митишев, Е.В. Преснякова, Е.Ф. Семенова, М.А. Гурина // Известия вузов. Поволжский регион. Естественные

науки. – 2014. – № 4. – С. 19–28. – URL: <https://e.lanbook.com/journal/issue/298957> (дата обращения: 18.02.2021).

4. Дворецкий Д.С., Пешкова Е.В., Темнов М.С. Экспериментальное определение технологических режимов роста биомассы микроводоросли хлорелла с повышенным содержанием липидов [Электронный ресурс] // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК-продукты здорового питания. – 2014. – № 2. – С. 32–38. – URL: <https://e.lanbook.com/journal/issue/291131> (дата обращения: 18.02.2021).

5. Нагорнов С.А., Мещерякова Ю.В. Исследование условий культивирования микроводоросли хлорелла в трубчатом фотобиореакторе // Вестник Тамбовского государственного технического университета. – 2015. – № 4. – С. 653-659. – URL: <https://e.lanbook.com/journal/issue/296304> (дата обращения: 19.02.2021).

Об авторах

Васильева Виктория Александровна – студентка бакалавриата кафедры «Биотехнология, технология общественного питания и товароведение», Омский государственный технический университет, e-mail: vbalchugova00@mail.ru.

Евдокимов Никита Сергеевич – доцент кафедры «Биотехнология, технология общественного питания и товароведение», Омский государственный технический университет, e-mail: ens17@mail.ru.

Сафиулова Валерия Ринатовна – студентка бакалавриата кафедры «Биотехнология, технология общественного питания и товароведение», Омский государственный технический университет, e-mail: valeriya.safiulova@mail.ru.

Фомичева Антонина Александровна – студентка бакалавриата кафедры «Биотехнология, технология общественного питания и товароведение», Омский государственный технический университет, e-mail: nata.fomi4ewa@gmail.com.

**Д.А. Веретенникова, А.А. Балueva,
А.С. Олькова, Е.В. Баньковская, О.В. Гашкова,
И.П. Рудакова, И.В. Тонкоева**

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НЕКОТОРЫХ АРИЛАМИДОВ АМИНОКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Представлены результаты синтеза солей ариламидов аминокислот. У всех соединений определена острая токсичность при внутривенном введении. Проведено КССА-моделирование с использованием элементов корреляционно-регрессионного анализа с помощью программы Excel. Предложены линейные и нелинейные модели зависимости острой токсичности веществ от молекулярной массы, температуры плавления и показателя константы кислотности соединений.

Ключевые слова: ариламиды аминокислот, КССА-модели, корреляционно-регрессионный анализ, острая токсичность.

**D.A. Veretennikova, A.A. Balueva,
A.S. Olkova, E.V. Bankovskaya, O.V. Gashkova,
I.P. Rudakova, I.V. Tonkoeva**

SYNTHESIS AND STUDY OF ACUTE TOXICITY OF SOME AMINOCARBOXYLIC ACID ARYLAMIDES

The article presents the results of the synthesis of aminocarboxylic acid arylamide salts. All compounds were found to have acute toxicity when administered intravenously. A QSAR register simulation was performed using elements of correlation and regression analysis using the Excel program. Linear and nonlinear models of the dependence of the acute toxicity of substances on the molecular weight, melting point, and the index of the acidity constant of compounds are proposed.

Keywords: arylamides of aminocarboxylic acids, QSAR models, correlation and regression analysis, acute toxicity.

Нарушения сердечного ритма представляют собой одно из наиболее частых проявлений таких заболеваний сердечно-сосудистой системы, как ишемическая болезнь сердца, острый инфаркт миокарда, гипертоническая болезнь и ряд других патологий. Препараты, применяемые для лечения аритмий, имеют множество

побочных эффектов. Ввиду этого поиск новых соединений, обладающих низкой токсичностью, является актуальным.

Целью данной работы является выявление зависимости фармакологической активности от физико-химических свойств некоторых производных ариламинов *N,N*-диэтиламиноэтановой кислоты.

Для достижения цели были сформулированы следующие задачи: синтез и определение острой токсичности некоторых солей ариламинов *N,N*-диэтиламиноэтановой кислоты; выявление качественной и количественной зависимости между некоторыми физико-химическими свойствами и острой токсичностью соединений; формулировка рекомендаций по целенаправленному поиску биологически активных соединений.

Объектом исследования являются соли ариламида *N,N*-диэтиламиноэтановой кислоты с некоторыми неорганическими кислотами, синтезированные на кафедре органической химии ПГФА. Схема синтеза соединений представлена на рисунке.

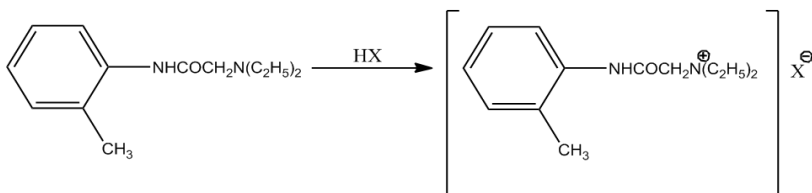


Рис. Схема синтеза солей ариламинов аминокислот:

$\text{X}^- = \Gamma(1\text{f}), \text{ClO}_4^-(1\text{ч}), \text{Br}^-(1\text{y}), \text{Cl}^-(1\text{a}), \text{NO}_3^-(1\text{x}), \text{H}_2\text{PO}_4^-(1\text{ц})$

В спектре ЯМР ^1H (BS-567A 100 МГц) в CDCl_3 , DMSO, внутренний стандарт – гексаметилдисиоксан (ГМДС)) 2-метилфениламида *N,N*-диэтиламиноэтановой кислоты наблюдаются полосы: триплет шести протонов этильного радикала в области 1,1–1,3 м.д., синглет трех протонов метильной группы ароматического кольца при 2,3 м.д., квадруплет четырех протонов CH_2 -группы этильного радикала при 2,5–2,8 м.д., синглет двух протонов CH_2 -группы углеродной цепочки при 3,1 м.д., мультиплет четырех протонов ароматического кольца ариламида в области 6,9–7,4 м.д., уширенный синглет протона -NH-группы при 9,3 м.д. [1].

Для выявления качественной и количественной зависимости острой токсичности от физико-химических свойств соединений

были выбраны: молекулярная масса M_r , температура плавления $T_{пл}$ и показатель константы кислотности соединений pK_a , значения которых представлены в табл. 1.

Таблица 1

Физико-химические свойства солей ариламида
N,N-диэтиламиноэтановой кислоты

Соединение	HX	M_r , г/моль	$T_{пл}$, °C	pK_a
1ф	HI	348,0	167 (166–168)	–11,00
1ч	HClO ₄	320,5	199 (198–200)	–10,00
1у	HBr	301,0	125 (124–126)	–9,00
1а	HCl	256,5	117 (116–118)	–7,00
1х	HNO ₃	283,0	133 (132–134)	–1,64
1ц	H ₃ PO ₄	318,0	137 (136–138)	2,12

Острую токсичность соединений определяли на белых нелинейных мышах обоего пола при внутривенном введении [2]. Вещества вводили растворенными в изотоническом растворе хлорида натрия из расчета 0,1 мл на 10 г живого веса. Результаты обрабатывали по Прозоровскому с вычислением средней смертельной дозы (LD_{50}) при $P < 0,05$ [3].

Результаты определения острой токсичности веществ приведены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты определения острой токсичности веществ

Соединение	HX	LD_{50}	$lg(1/LD_{50})$
1ф	HI	60,0 (48,0–74,0)	–1,77815
1ч	HClO ₄	89,0 (75,0–106,0)	–1,94939
1у	HBr	81,5 (71,0–84,0)	–1,91116
1а	HCl	46,0 (33,0–60,0)	–1,66276
1х	HNO ₃	65,0 (56,0–75,0)	–1,81291
1ц	H ₃ PO ₄	44,7 (37,0–59,0)	–1,65031
Лидокаин		39,3 (34,2–44,7)	–

Как видно из таблицы, анион кислоты существенно влияет на величину острой токсичности исследуемых веществ. Наименьшую токсичность проявили соли бромистоводородной и хлорной кислот.

С целью установления количественной зависимости между физико-химическими свойствами солей ариламида *N,N*-диэтиламино-

этановой кислоты и острой токсичностью, было проведено КССА-моделирование с использованием элементов корреляционно-регрессионного анализа с помощью программы Excel. Были составлены уравнения линейной, квадратичной, логарифмической регрессий, а также уравнение 3-й степени. Результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Корреляционная зависимость средней смертельной дозы от физико-химических свойств веществ

№ п/п	Уравнение корреляции	n^*	r^{**}	R^2^{***}	$\bar{A}^{****}$
1	$\lg(1/LD_{50}) = 6 \cdot 10^{-3}(Mr)^2 - 0,037(Mr) + 3,860$	6	0,536	0,288	5,751
2	$\lg(1/LD_{50}) = -0,002(T_{\text{пл}}) - 1,479$	6	0,539	0,290	4,721
3	$\lg(1/LD_{50}) = -2 \cdot 10^{-6}(T_{\text{пл}})^3 + 0,001(T_{\text{пл}})^2 - 0,147(T_{\text{пл}}) + 5,436$	6	0,648	0,416	53,652
4	$\lg(1/LD_{50}) = 0,014(pKa) - 1,711$	6	0,573	0,329	4,819
5	$\lg(1/LD_{50}) = 0,0003(pKa)^3 + 0,005(pKa)^2 + 0,025(pKa) - 1,741$	6	0,599	0,359	4,444

Примечание: * – количество веществ; ** – коэффициент корреляции; *** – коэффициент детерминации; **** – средняя ошибка аппроксимации.

Всего было составлено 11 уравнений, связывающих величину LD_{50} с различными физико-химическими свойствами.

Таким образом, для дальнейших углубленных исследований рекомендуются соли бромистоводородной и хлорной кислот 2-метилфениламида *N,N*-диэтиламиноэтановой кислоты, которые проявили наименьшую острую токсичность.

Список литературы

1. Гашкова О.В. Синтез, свойства и биологическая активность производных ариламидов аминокислот: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – Пермь, 2009. – 25 с.
2. Рудакова И.П. Фармакологическая оценка и анализ возможных механизмов антиаритмической активности и безопасности нового производного ариламидов аминокислот: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Челябинск, 2020. – 45 с.
3. Прозоровский В.Б. Практическое пособие по ускоренному определению средних эффективных доз и концентраций биологически активных веществ. – Байкальск, 1994. – 46 с.

Об авторах

Веретенникова Дарья Александровна – студентка, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: dashveretennikova@mail.ru.

Балуева Анна Андреевна – студентка, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: balueva278@gmail.com.

Олькова Алина Сергеевна – студентка, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: alinaolkova03@gmail.com.

Баньковская Екатерина Владимировна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры «Химические технологии», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: albit2302@mail.ru.

Гашкова Оксана Владиславовна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры «Общая и биоорганическая химия» Пермская государственная фармацевтическая академия, e-mail: artucha2011@yandex.ru.

Рудакова Ирина Павловна – кандидат медицинских наук, заведующая кафедрой «Физиология», Пермская государственная фармацевтическая академия, e-mail: Rudakova@pfa.ru.

Тонкоева Ирина Валерьевна – старший преподаватель кафедры «Высшая математика», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: iratonkoeva@yandex.ru.

С.Е. Возисов, А.Ю. Максимов

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОМПСТИРОВАНИЯ
ИЗБЫТОЧНОГО АКТИВНОГО ИЛА ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ
НЕФТЕХИМИЧЕСКИХ ПРЕДПРИЯТИЙ**

Исследовано компстирование избыточного активного ила – отхода процесса очистки сточных вод – с применением бактериальных препаратов на основе сообществ бактерий-деструкторов. Рассмотрено влияние температуры и продолжительности процесса на сухой остаток микробиологической массы. Рассчитаны коэффициенты уравнения регрессии, приведены выводы по коэффициентам.

Ключевые слова: избыточный активный ил, компстирование, бактериальный препарат.

S.E. Vozisov, A.Yu. Maximov

**THEORETICAL BASES FOR COMPOSTING
EXCESSIVE ACTIVE SLUDGE OF TREATMENT FACILITIES
OF PETROCHEMICAL ENTERPRISES**

The composting of excess activated sludge of wastewater treatment with the use of bacterial preparations based on communities of bacteria-destructors has been studied. The influence of temperature and duration of the process on the dry residue of the microbiological mass is considered. The coefficients of the regression equation are calculated, conclusions on the coefficients are given.

Keywords: excess activated sludge, composting, bacterial preparation.

Мировая тенденция показывает, что внедрение современных экологических нормативов, объединенных в систему экологического менеджмента, которая реализуется по стандарту ISO 14000, требует от предприятий химической и нефтехимической отраслей ряда перевооружений. В частности, они должны влиять на качество и количество отходов предприятия [1].

На данный момент отработанный активный ил, являющийся отходом установок по очистке сточных вод, преимущественно утилизируется захоронением в почве, что несет в себе колоссальную угрозу экологии локального района. Анализ литературных источников показывает, что в мировой практике существует несколько

методов биотехнологической переработки отработанного активного ила. Это несет экономическую и экологическую выгоду, так как в активном иле могут присутствовать микроорганизмы, богатые биологически активными веществами, которые можно направить в цикл вторичного использования. В частности, существуют исследования, показывающие, что микроорганизмы биоценоза активного ила могут быть переработаны в органические удобрения путем компостирования с применением бактериальных препаратов на основе искусственного сообщества бактерий-биодеструкторов [2, 3].

Представленная работа посвящена изучению закономерности влияния технологических параметров процесса компостирования избыточного активного ила очистных сооружений предприятия нефтехимического синтеза на степень биodeградации микробиологической массы. В этой связи настоящая работа представляет интерес как для понимания степени влияния исследуемых факторов на процесс компостирования избыточного активного ила, так и для разработки установки по утилизации отходов биологической очистки сточных вод, обрабатываемых на территории нефтехимических предприятий.

В качестве факторов, оказывающих влияние на результат эксперимента, были выбраны температура и продолжительность процесса компостирования, которые являются важными технологическими параметрами при проектировании установки по переработке отходов очистки сточных вод. Мерой оценки результатов данного эксперимента является масса сухого вещества, оставшегося после компостирования избыточного активного ила. Уменьшение значения данной характеристики будет свидетельствовать об эффективности компостирования в данных технологических условиях.

В исследовании в качестве опытного образца был использован избыточный активный ил с массой сухого вещества, равной 26,7 г, который был усреднен и замешан бактериальным препаратом «Байкал ЭМ-1» (модельный бактериальный препарат) в пропорции 1 часть препарата на 100 частей ИАИ в рамках симуляции рабочей среды биореактора компостирования. В рамках двухфакторного эксперимента задана температура компостирования в диапазоне от 30 °C до 50 °C, а продолжительность компостирования варьировалась в диапазоне от 5 до 10 суток, данные измерений массы сухого вещества по окончании процесса компостирования представлены в таблице.

Исходная матрица планирования двухфакторного эксперимента

Номер опыта	Изучаемые факторы		Масса сухого вещества по окончании эксперимента, г		
	$t_{\text{пр}}, \text{сут}$	$T, ^\circ\text{C}$	y_1	y_1	y_3
1	5	50	14,67	14,17	14,99
2	5	30	20,97	20,55	20,71
3	10	50	10,98	11,12	10,68
4	10	30	15,54	16,26	14,9

Было получено следующее уравнение регрессии:

$$y = 15,46 + 2,69 \cdot x_1 - 2,21 \cdot x_2 - 0,37 \cdot x_1 x_2$$

Полученное уравнение позволяет рассчитать остаточную массу сухого вещества микроорганизмов избыточного активного ила по окончании процесса компостирования при диапазоне температур процесса от 30 до 50 °С, а также при продолжительности процесса компостирования от 5 до 10 суток. Данное уравнение позволяет масштабировать изучаемый процесс до промышленных установок утилизации ИАИ.

Проведем интерпретацию полученной модели. Известно, что чем больше величина коэффициента, тем больше фактор влияет на отклик. Расположим коэффициенты в порядке уменьшения их влияния на отклик:

$$b_1 = 2,69.$$

Исходя из уравнения, наибольшее влияние оказывает продолжительность процесса компостирования избыточного активного ила. Знак «плюс» перед коэффициентом указывает на снижение эффективности процесса. Возможно, это связано с тем, что при протяженном процессе снижается доля массы избыточного активного ила, однако при этом увеличивается доля массы бактерий-деструкторов за счет потребления питательных веществ.

$$b_2 = -2,21.$$

Данный коэффициент учитывает влияние фактора температуры, отрицательное значение коэффициента показывает, что с увеличением температуры процесса компостирование будет протекать лучше, т.е. со снижением массы сухого остатка. Это может

быть связано с увеличением скорости биохимических реакций, связанных с биодеструкцией избыточного активного ила.

$$b_3 = -0,37.$$

Коэффициент b_3 является отображением совокупного влияния обоих факторов на процесс. Как можно заметить, данный коэффициент значительно меньше других коэффициентов уравнения, что говорит о небольшом влиянии эффекта на процесс. Однако отрицательное значение коэффициента указывает на то, что оба фактора совокупно приводят к улучшению компостирования.

Список литературы

1. Ødegaard H., Paulsrud B., Karlsson I. Wastewater sludge as a resource: sludge disposal strategies and corresponding treatment technologies aimed at sustainable handling of wastewater sludge // *Water Science and Technology*. – 2002. – Vol. 46, iss. 10. – P. 295–303.
2. From municipal/industrial wastewater sludge and FOG to fertilizer: A proposal for economic sustainable sludge management / B. Bratina [et al.] // *J. Environmental Management*. – 2016. – Vol. 183, iss. 3. – P. 1009–1025.
3. Фатина П.Н. Применение микробиологических препаратов в сельском хозяйстве // *Вестник АГТУ*. – 2007. – № 4. – С. 133–136.

Об авторах

Возисов Степан Евгеньевич – магистрант кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: vozisov.stepan@yandex.ru.

Максимов Александр Юрьевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, e-mail: almaks1@mail.ru.

О.Ш. Гоголишвили, Е.Н. Решетова

**АДСОРБЦИЯ ЭНАНТИОМЕРОВ 3-ФЕНИЛМОЛОЧНОЙ
КИСЛОТЫ НА ХИРАЛЬНОЙ НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗЕ
С ПРИВИТЫМ АНТИБИОТИКОМ ЭРЕМОМИЦИНОМ**

Изучена адсорбция энантиомеров 3-фенилмолочной кислоты на хиральной неподвижной фазе с привитым антибиотиком эремомицином в условиях ВЭЖХ. Рассчитаны термодинамические характеристики адсорбции из водно-этанольной и водно-ацетонитрильной подвижной фаз. Измерены изотермы адсорбции энантиомеров 3-фенилмолочной кислоты.

Ключевые слова: адсорбция, энантиомеры, хиральные неподвижные фазы, эремомицин, макроциклические антибиотики.

O.Sh. Gogolishvili, E.N. Reshetova

**ADSORPTION OF 3-PHENYLLACTIC ACID ENANTIOMERS
ON CHIRAL STATIONARY PHASE WITH GRAFTED
ANTIBIOTIC EREMOMYCIN**

The adsorption of enantiomers of 3-phenyllactic acid on the chiral stationary phase with the grafted antibiotic eremomycin under HPLC conditions was studied. The thermodynamic characteristics of the adsorption from the water-ethanol and water-acetonitrile mobile phases are calculated. The adsorption isotherms of 3-phenyllactic acid enantiomers were measured.

Keywords: adsorption, enantiomers, chiral stationary phases, eremomycin, macrocyclic antibiotics.

Большинство лекарственных препаратов часто используются в клинической практике в виде рацемических смесей. Однако энантиомерно чистые препараты обеспечивают более высокие терапевтические показатели [1]. Например, энантиомеры 3- фенилмолочной кислоты (3-ФМК) обладают антибактериальными свойствами, однако *R*-энантиомер проявляет более высокую активность в отношении листерий по сравнению с *S*-энантиомером [2]. В свою очередь, *S*-энантиомер 3-ФМК используется в производстве хиральных противоопухолевых и противовирусных препаратов [3]. Таким образом, получение оптически чистых соединений является одной

из приоритетных задач мировой фармацевтической промышленности. Жидкостная хроматография на хиральных неподвижных фазах (ХНФ) – эффективный и достаточно экономичный метод для решения задачи энантиоразделения. Одной из важных проблем препаративной жидкостной хроматографии является введение процесса энантиоразделения в технологический цикл фармацевтического производства. Основную роль в оптимизации таких энантиоразделений играет эмпирическая оценка изотерм адсорбции.

Представленная работа посвящена изучению адсорбции энантиомеров 3-ФМК на ХНФ *Nautilus-E* (250×4,6 мм) с привитым макроциклическим гликопептидным антибиотиком эремомицином. Исследование выполнено на жидкостном хроматографе Agilent 1100 Series. В качестве подвижных фаз (ПФ) использованы смеси 0,1М водных ацетатных буферных растворов с органическими модификаторами – этанолом или ацетонитрилом (60:40 об/об). Измерения изотерм адсорбции энантиомеров 3-ФМК проводили в диапазоне температур 22–50 °С с рабочими растворами энантиомеров 1 и 10 мг/мл, объем вводимой пробы варьировали в диапазоне 5–100 мкл. Для регистрации хроматограмм и обработки полученных результатов использовался программный комплекс Chem-Station Rev.A. 08. 03 Rus.

Изотермы адсорбции были рассчитаны с использованием модифицированного метода Глюкауфа (ур.1) [4], заключающегося в построении зависимости исправленного удерживаемого объема (V'_R) от концентрации (C) и дальнейшем интегрировании полученной кривой.

$$q(C') = \frac{1}{V_a} \int_0^C (V(C_1) - V_0) dC_1,$$

где q и C' – равновесные значения концентрации вещества в твердой и жидкой фазе, соответственно; V_0 – мертвый объем, V_a – объем адсорбента в колонке; $V(C_1)$ – объем ПФ V , прошедшей через колонку до того, как порция элюата с концентрацией адсорбата C_1 покинет колонку.

На основании данных о времени удерживания энантиомеров были рассчитаны термодинамические характеристики адсорбции по уравнению Вант – Гоффа:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \varphi,$$

где ΔH^0 и ΔS^0 – стандартные энтальпия и энтропия, R – универсальная газовая постоянная, T – средняя арифметическая температура (в данном исследовании 308,5 К), φ – фазовое отношение (объем НФ V_a , отнесенный к объему ПФ V_0).

На рис. 1 приведены концентрационные профили энантиомеров 3-ФМК, полученные в ПФ различного состава. Видно, что с увеличением ввода пробы в поток элюента время удерживания S - и R -энантиомеров 3-ФМК постепенно уменьшается, а профили приобретают асимметричную форму с вытянутыми хвостами. Такая форма кривых элюирования характерна для изотерм адсорбции Лэнгмюра. При высоких концентрациях энантиомеров форма профилей не искажается.

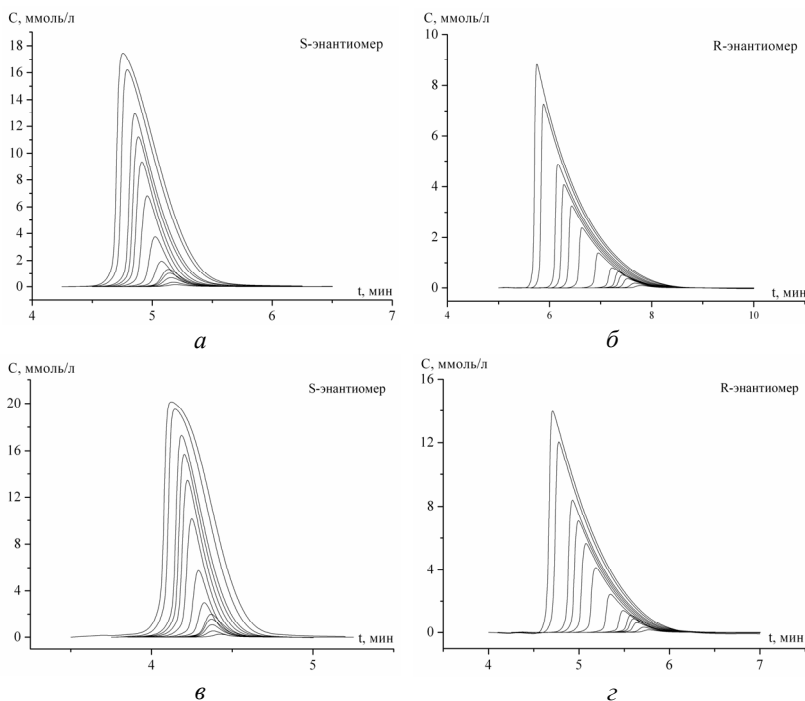


Рис. 1. Концентрационные профили энантиомеров 3-ФМК, полученные в водно-этанольной (*а*, *б*) и водно-ацетонитрильной ПФ (*в*, *г*) при $T = 22$ °С

Первым элюируемым энантиомером в серии экспериментов является *S*-изомер, поэтому изотермы адсорбции для *S*-формы лежат ниже, чем *R* (рис. 2). Из рис. 2 видно, что изотермы адсорбции характеризуются слабой нелинейностью, т.е. они обращены выпуклостью к оси адсорбции. Данное обстоятельство говорит о том, что большие концентрации перемещаются с большей скоростью, чем малые, что приводит к обострению фронта пика и растягиванию задней границы хроматограммы. Это явление более выражено для *R*-энантиомера (см. рис. 1), что формально соответствует требованиям метода Глюкауфа – острый фронт и совпадение размытых ветвей хроматограмм. Выявлено, что использование этанола в качестве органического модификатора ПФ обеспечивает более высокие значения адсорбции энантиомеров 3-ФМК (см. рис. 2) и показатели селективности разделения (2,43), чем применение ацетонитрила (2,15).

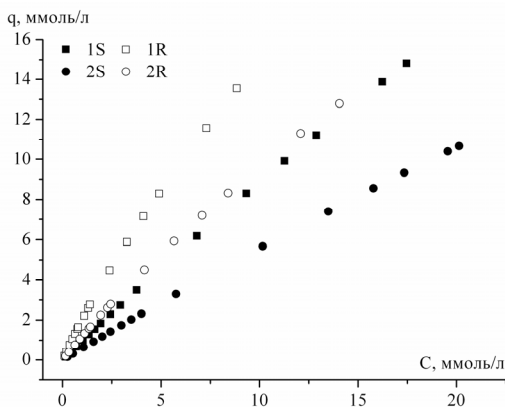


Рис. 2. Изотермы адсорбции энантиомеров 3-ФМК, полученные в водно-этанольной ПФ (1S, 1R) и водно-ацетонитрильной ПФ (2S, 2R)

Анализ термодинамических характеристик (таблица) показывает, что вклад энтропии в свободную энергию адсорбции энантиомеров больше величины ΔH^0 , что указывает на рост разупорядоченности в системе и образование нестабильного поверхностного комплекса адсорбат–адсорбент. Таким образом, стерические факторы оказывают большее влияние на удерживание энантиомеров 3-ФМК, чем энергетические изменения. Лишь для *R*-энантиомера адсорбция из водно-этанольной ПФ является энтальпийно

контролируемым процессом, так как энтальпийный терм отрицателен и превышает энтропийный вклад.

Термодинамические характеристики адсорбции (кДж/моль)

Модификатор ПФ	Энантиомер	$-\Delta H^0$	$-T\Delta S^0$	ΔG^0	$\Delta(\Delta H^0)$	$T\Delta(\Delta S^0)$	$-\Delta(\Delta G^0)$
Этанол	S	11,91	12,71	0,80	-10,44	-8,66	1,79
	R	22,35	21,36	-0,99			
Ацетонитрил	S	6,69	8,33	1,64	-8,63	-7,08	1,55
	R	15,33	15,41	0,09			

Энантиораспознавание определяется преимущественно энтальпийной составляющей, так как $\Delta\Delta H^0 < 0$ и $|\Delta\Delta H^0| > |T\Delta\Delta S^0|$. Природа органического модификатора существенно влияет на термодинамические характеристики адсорбции – в водно-ацетонитрильном элюенте абсолютные величины энтальпии и энтропии адсорбции примерно в 1,5 раза ниже таковых в водно-этанольной смеси при сопоставимом составе ПФ. Очевидно, это связано с особенностями сольватации участников адсорбционного взаимодействия в системах «вода – этанол» и «вода – ацетонитрил».

Список литературы

1. Bhupinder S.S. Exploiting the power of stereochemistry in drugs: an overview of racemic and enantiopure drugs // J. Mod. Med. Chem. – 2013. – Vol. 1, no. 1. – P. 10–36.
2. Purification and characterization of anti-Listeria compounds produced by Geotrichum candidum / V. Dieuleveux, D. Van Der Pyl, J.G. Chataud [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – Vol. 64. – P. 800–803.
3. Chemistry of the mycalamides: anti-viral and anti-tumor compounds from a New Zeland marine sponge / D. Abell, A.W. Blunt, J.J. Foulds [et al.] // J. Chem. Soc. Perkin Trans. – 1997. – P. 1647–1654.
4. Asnin L., Kaczmariski K., Guiochon G. The adsorption of Naproxen enantiomers on the chiral stationary phase Whelk-O1 under reversed-phase conditions: The effect of buffer composition // J. Chromatogr. A. – 2010. – Vol. 1217, no. 17. – P. 7055.

Об авторах

Гоголишвили Отар Шотаевич – аспирант Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Институт технической химии УрО РАН, e-mail: otar5993@mail.ru.

Решетова Елена Николаевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Институт технической химии УрО РАН, e-mail: lenire@yandex.ru.

К.С. Давыдова, Т.В. Полюдова, В.П. Коробов

АДГЕЗИЯ БАКТЕРИЙ НА АДсорбЦИОННО МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ ПОЛИМЕРОВ

Обработка полимеров растворами хитозана оказывает влияние на уровень гидрофобности их поверхностей, что приводит к изменению адгезионной активности бактерий к адсорбционно модифицированным полимерам.

Ключевые слова: адгезия, адсорбция, низкомолекулярный хитозан, полистирол, полипропилен, целлофан, *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus epidermidis*.

K.S. Davydova, T.V. Polyudova, B.P. Korobov

ADHESION OF BACTERIA ON ADSORPTION MODIFIED SURFACES OF POLYMERS

The treatment of polymers with chitosan solutions affects the level of hydrophobicity of their surfaces, which leads to a change in the adhesion activity of bacteria to adsorption modified polymers.

Keywords: adhesion, adsorption, low molecular weight chitosan, polystyrene, polypropylene, cellophane, *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus epidermidis*.

Синтетические полимеры могут быть использованы в качестве матрицы для удержания антимикробных агентов. Применение полимерных материалов с антимикробными свойствами вызывает все больший интерес как в теоретическом, так и в прикладном аспекте. Известные антимикробные полимерные покрытия получают посредством импрегнирования, адсорбции или ковалентного связывания антимикробных агентов на различных поверхностях с получением пленочного слоя. Идеальным кандидатом для покрытия полимеров является хитозан, обладающий выраженной антимикробной активностью и способностью образовывать пленки посредством электростатических и водородных связей, которые формируются при высушивании [1, 2].

Целью настоящей работы явилось изучение сорбции хитозана на поверхности различных полимеров с последующей оценкой адгезии бактерий на импрегнированных хитозаном поверхностях.

Материалы и методы

Объектом исследования явились полимеры полипропилен, полистирол и целлофан, которые обрабатывали растворами хитозана с мол. массой 28 кДа и степенью дезацетилирования (ДА) 98 % (X28/98), 68 % (X28/68) и 53 % (X28/53). Образцы хитозана были предоставлены д-р хим. наук, заведующим лабораторией Инженерии биополимеров В.П. Варламовым (Институт биоинженерии ФИЦ биотехнологии РАН, г. Москва). Хитозан растворяли в 0,1%-ной уксусной кислоте до концентрации 1 мг/мл. Полимерные пластинки размером 15×15 мм помещали в раствор хитозана и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Далее раствор удаляли, полимер трижды промывали стерильной водой. После высушивания определяли уровень гидрофобности поверхностей путем измерения краевого угла смачивания по модифицированному методу сидячей капли [3].

Для изучения адгезии бактерий на нативных и обработанных хитозаном поверхностях использовали бактерии *Mycobacterium smegmatis* mc² 155, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* M-17. С этой целью 3 мл суспензии отмытых бактериальных клеток (10^7 КОЕ/мл) вносили в емкость с полимерной пластинкой, инкубировали 15 мин. Затем жидкость удаляли, полимеры трижды промывали 3 мл стерильной воды и окрашивали 0,1%-ным раствором генцианвиолета 10 мин. После отмывки красителя и высушивания поверхность просматривали на микровизоре «Ломо» (Россия) при увеличении ×1000. Количество связавшихся с поверхностью клеток определяли прямым счетом не менее чем в 10 полях зрения, рассчитывая среднее количество адгезированных бактерий в поле зрения микровизора.

Результаты и их обсуждение

Обработка поверхности полистирола растворами низкомолекулярного хитозана, вне зависимости от степени его ДА, уменьшает гидрофобность полистирола в среднем в 1,15 раз (таблица). Адсорбция растворов хитозана на полипропилене незначительно изменяет гидрофобность его поверхности, увеличивая ее не более чем в 1,14 раз. Адсорбция образцов хитозана с разной степенью ДА на поверхностях целлофана значительно изменяет краевой угол смачивания, увеличивая гидрофобность этой поверхности примерно в 30 раз.

Изменение краевых углов смачивания полимеров после адсорбции хитозана с разной степенью дезацетилирования

Обработка поверхности	Полистирол	Полипропилен	Целлофан
Необработанная поверхность	66,03°±4,63°	74,12°±6,34°	0°
0,1%-ная уксусная кислота	64,16°±4,12°	80,06°±8,17°	0°
X28/98	57,28°±5,53°	71,22°±5,86°	28,34°±2,08°*
X28/68	58,19°±5,65°	84,27°±7,22°	33,25°±2,39°*
X28/53	55,07°±5,39°*	83,15°±7,38°	29,09°±2,16°*

Примечание: * – данные достоверно отличаются от контроля при $p = 0,05$.

Адгезия бактерий к нативному полистиролу и обработанному низкомолекулярным хитозаном с разной степенью ДА была неодинаковой. Так, адгезия микобактерий на полистироле после обработки хитозаном достоверно снижалась лишь на поверхности, обработанной раствором X28/98. Адсорбция хитозана на полипропилене не приводила к достоверному изменению адгезионной активности микробактерий. Обработка целлофана всеми растворами хитозана способствовала увеличению числа закрепленных на модифицированном целлофане клеток *M. Smegmatis* mc² 155 (рисунок).

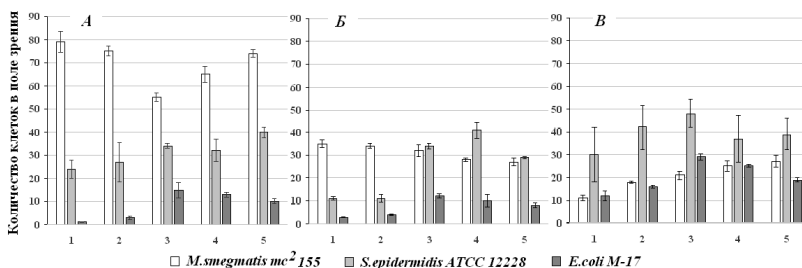


Рис. Количество бактериальных клеток, адгезированных на поверхностях полистирола (а), полипропилена (б) и целлофана (в): 1 – необработанная поверхность, 2 – обработанная 0,1%-ной уксусной кислотой, 3 – обработанная раствором X28/98, 4 – обработанная раствором X28/68, 5 – обработанная раствором X28/53

Данные рисунка также свидетельствуют о том, что увеличение адгезии бактерий *S. epidermidis* ATCC 12228 и *E.coli* M-17 наблюдалось практически на всех поверхностях после их обработки растворами хитозана.

Результаты, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют о том, что адсорбция низкомолекулярного хитозана на поверхностях полимеров происходит неэффективно. Более высокая степень адсорбции хитозана, выявленная на целлофане, вероятно, связана с высокой водопоглощающей способностью этого полимера. Вместе с тем это способствовало более эффективному связыванию бактерий с модифицированным целлофаном.

Полимерные пленки с ценными биологическими свойствами, получаемые методом литья из раствора, показаны только для высокомолекулярного хитозана с молекулярной массой более 100 кДа [4]. Низкомолекулярный хитозан, обладающий лучшей растворимостью в воде и проявляющий более высокую антибактериальную активность, может быть использован для подавления роста планктонных микроорганизмов [5].

Список литературы

1. Варламов В.П., Немцев С.В., Тихонов В.Е. Хитин и хитозан: природа, получение и применение / Рос. хитиновое о-во. – М., 2010. – 292 с.
2. Hosseinnjad M., Jafari S.M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan // Int. J. Biological Macromolecules. – 2016. – Vol. 85. – P. 467–475.
3. Лабораторные работы и задачи по коллоидной химии / под ред. Ю.Г. Фролова, А.С. Гродского. – М.: Химия, 1986.
4. Луньков А.П., Ильина А.В., Варламов В.П. Антиоксидантные, антибактериальные и фунгицидные свойства пленок на основе хитозана (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54, № 5. – С. 444–454.
5. Создание лекарственных форм на основе низкомолекулярного хитозана и изучение их биологической активности / В.В. Сайфетдинова, Т.А. Байтукалов, О.С. Пахомов, А.С. Шеремет, В.И. Иванова-Радкевич, О.А. Богословская, Н.Н. Глущенко, И.П. Ольховская, М.Н. Овсянникова, В.П. Варламов, С.А. Лопатин // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия Медицина. – 2004. – № 4'(28). – С. 309–314.

Об авторах

Давыдова Карина Сергеевна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: karja_1999@mail.ru.

Полюдова Татьяна Вячеславовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, e-mail: poludova76@mail.ru.

Коробов Владимир Павлович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: korobov@iegm.ru.

А.А. Данько, Н.Б. Ходяшев

**ВЫДЕЛЕНИЕ КУЛЬТУРЫ *LACTOCOCCUS LACTIS*
SUBSP. CREMORIS, ОПИСАНИЕ ЕЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ
И ОТДЕЛЬНЫХ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ**

Выделена молочнокислая культура из лиофилизированной бактериальной закваски и фермерского молока. Проведено ее морфологическое описание и исследованы культуральные свойства. Выявлено, что выделенной культурой является *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

Ключевые слова: *Lactococcus cremoris*, выделение, культуральные свойства.

A.A. Dan'ko, N.B. Khodyashev

**ISOLATION OF CULTURE *LACTOCOCCUS*
LACTIS SUBSP. CREMORIS, DESCRIPTION OF ITS
MORPHOLOGICAL AND INDIVIDUAL CULTURAL PROPERTIES**

The lactic acid culture from lyophilized bacterial starter culture and farm milk was isolated. Its morphological description was carried out and cultural properties were investigated. It was revealed that the isolated culture was *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

Keywords: *Lactococcus cremoris*, isolation, cultural properties.

Молочнокислые бактерии – группа грамположительных, неспорообразующих, факультативно аэробных микроорганизмов.

Основным свойством, по которому молочнокислых микроорганизмов объединяют в отдельную обширную группу, является способность образовывать в качестве главного продукта брожения молочную кислоту. Молочнокислое брожение осуществляют бактериальные организмы, гетерогенные по морфологии, принадлежащие к родам *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* [1].

Lactococcus lactis subsp. cremoris, или сливочный стрептококк относится к роду *Lactococcus*. По своей форме клетки напоминают шар или эллипс, которые расположены в виде коротких и длинных цепочек. Оптимальная температура роста 25–30 °С. Сли-

вочный стрептококк используется в заквасках для творога, сметаны и других кисломолочных продуктов [2].

Материалы и методы исследования

Источниками выделения молочнокислых бактерий являлись бактериальная закваска «Творог» марки «Свой йогурт» и фермерское молоко из д. Вилижной Чусовского района. Бактериальный состав закваски: *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*.

При разделении смешанных лактококков использовали среду Редди с аргинином [1]. На этой среде *L. lactis subsp. cremoris*, не гидролизующий аргинин, образует желтые колонии, а *L. subsp. diacetylactis* и *L. subsp. lactis* – белые.

Исследования заключались в изучении динамики роста и кислотообразования молочнокислых культур. Скорость накопления биомассы фиксировали нефелометрическим методом на фотоколориметре AP-101 при 460 нм. Кривые роста строили в координатах «lgD – τ». pH определяли в начале и в конце процесса культивирования на ионометре лабораторном И-160. Количественный учет микроорганизмов проводился согласно ГОСТ 26670–91. «Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов» [3].

Кислотность среды определялась методом титрования с применением индикатора фенолфталеина в соответствии с ГОСТ 3624–92. «Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности» [4].

При построении зависимостей, описывающих логарифм числа живых клеток от времени, использовали жидкие питательные среды MRS и синтетическую среду, состав которых приведен в источниках [1, 5].

Результаты и их обсуждение

Морфологические особенности выделенных культур приведены ниже.

Признаки роста микроорганизмов являются схожими для обеих культур.

С помощью микроскопирования было установлено, что клетки представлены кокками сферической или эллипсоидной формы, которые расположены в виде коротких и длинных цепочек. Со-

гласно определителю Берджи и другим литературным данным можно сделать вывод, что выделилась культура *Lactococcus lactis subsp. cremoris* [6].

Морфологическое описание полученных культур

Форма	Сферическая
Диаметр	Точечные или до 10 мм
Цвет	Желтый
Поверхность	Гладкая
Профиль	Каплевидный или бугристый
Край	Гладкий
Структура	Однородная
Консистенция	Пастообразная

Изучен рост выделенных культур на синтетической среде и среде MRS. Полученные результаты приведены на рисунке.

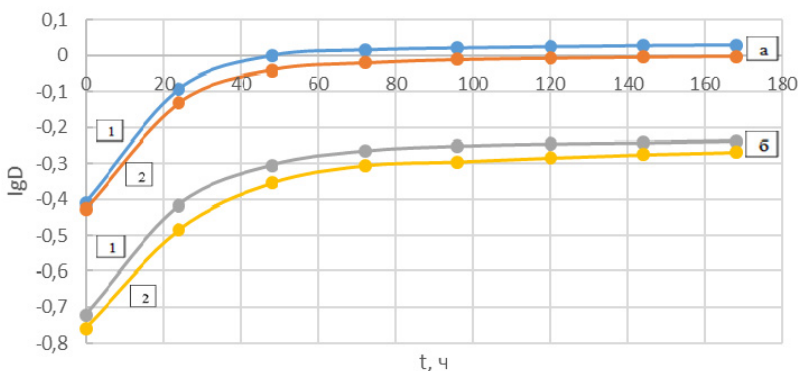


Рис. Зависимости кривых роста полученных культур на MRS (а) и синтетической (б) питательных средах: 1 – культура, выделенная из бактериальной закваски; 2 – культура, выделенная из фермерского молока

Как следует из приведенного рисунка, кривые роста для обеих выделенных культур на каждой из сред имеют приблизительно одинаковый характер, что является еще одним доказательством их идентичности.

Кроме того, представленные зависимости свидетельствуют о том, что обе культуры не имеют выраженных отличий в длительности фаз роста и активности накопления биомассы. На двух средах

экспоненциальная фаза роста продолжается в течение первых суток культивирования, далее рост замедляется, и культура выходит на стационарную фазу через 3 дня после инокуляции. В качестве источников углерода как глюкоза (среда MRS), так и лактоза (синтетическая среда) одинаково подходят для прироста биомассы. Наиболее динамичным биоорганизмом является культура, выделенная из бактериальной закваски «Творог».

Определена кислотообразующая способность культуры *L. cremoris*. Поскольку род *Lactococcus* принадлежит к гомоферментативным микроорганизмам, образуется значительное количество молочной кислоты (до 90 %), остальная часть субстрата приходится на побочные продукты.

Как показывают экспериментальные данные, во время инкубационного периода выделение молочной кислоты бактериями не осуществляется. В экспоненциальную фазу роста происходит активное выделение молочной кислоты. Рост содержания молочной кислоты наблюдается в течение первых 3 суток культивирования. Возможно, высокое содержание молочной кислоты приводит в дальнейшем к ингибированию роста культуры, и поэтому зависимости приобретают дугообразный характер. При этом наибольшей способностью к накоплению бактериями молочной кислоты обладает среда MRS, имеющая разнообразный компонентный состав.

Выводы

1. Выделена и идентифицирована культура молочнокислых бактерий из бактериальной закваски «Творог» и фермерского молока. Морфологические особенности полученных культур соответствуют литературным данным.

2. Построены кривые роста на различных питательных средах. Выявлено, что культуры имеют схожий характер роста.

3. Исследована тенденция кислотообразования в культуральной жидкости. С течением времени происходит накопление молочной кислоты, сопровождающееся понижением уровня pH.

4. В соответствии с результатами экспериментов наиболее активным видом является культура, выделенная из бактериальной закваски «Творог».

Список литературы

1. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. вузов / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук [и др.]; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
2. Красникова Л.В., Гунькова П.И., Маркелова В.В. Микробиология молока и молочных продуктов: учеб.-метод. пособие / НИУ ИТМО; ИХиБТ. – СПб., 2013. – 85 с.
3. ГОСТ 26670–91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов. – Взамен 26670–85. – Введ. 1993-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 1992.
4. ГОСТ 3624–92. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности. – Взамен ГОСТ 3624–67. – Введ. 1994-01-01. – М.: ИПК Изд-во стандартов, 2004.
5. Волкова Г.С., Кукусова Е.В., Римарева П.В. Идентификация и отбор культур *Lactococcus lactis* для защитно-профилактических пищевых и кормовых добавок // Достижения науки и техники. – 2016. – № 8. – С. 99.
6. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / Дж. Хоулт [и др.]. – М.: Мир, 1997. – Т. 2. – 325 с.

Об авторах

Данько Алена Андреевна – студентка, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: alyona.danko16@gmail.com.

Ходяшев Николай Борисович – доктор технических наук, заведующий кафедрой «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: nhodyashev@yandex.ru.

**В.А. Дьячкова, Л.И. Кононова,
И.А. Пьянков, В.П. Коробов**

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ
И ГИДРОФОБНОСТИ КЛЕТОК СТАФИЛОКОККОВ
НА ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ХИТОЗАНАМ**

Изучен состав мембранных липидов стафилококков и определены показатели гидрофобности их клеточных поверхностей. Проведен анализ степени чувствительности изучаемых бактерий к высокомолекулярным кватернизированным хитозанам в зависимости от этих физико-химических характеристик бактериальных клеток.

Ключевые слова: стафилококки, высокомолекулярные хитозаны, мембранные липиды, лизилфосфатидилглицерин, гидрофобность.

**V.A. Diachkova, L.I. Kononova,
I.A. Piankov, V.P. Korobov**

**EVALUATION OF THE EFFECT OF MEMBRANE
LIPIDS AND HYDROPHOBICITY OF STAPHYLOCOCCAL
CELLS ON THEIR SENSITIVITY TO CHITOSANS**

The composition of membrane lipids of staphylococci was studied and the hydrophobicity of their cell surfaces was determined. The analysis of the degree of sensitivity of the studied bacteria to high-molecular weight quaternized chitosans was carried out depending on these physicochemical characteristics of bacterial cells.

Keywords: staphylococci, high-molecular weight chitosan, membrane lipids, lysylphosphatidylglycerol, hydrophobicity.

Природные аминополисахариды хитозаны проявляют активность против широкого круга как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Известно, что это свойство обусловлено главным образом суммарным положительным зарядом молекул хитозанов, эффективность которого можно усилить увеличением растворимости, варьированием молекулярной массы и введением дополнительных заряженных групп в структуру этих соединений [1]. Механизм антибактериального действия хитозанов до конца не изучен, однако считается, что высокомолекулярные хитозаны

взаимодействуют только с поверхностью бактериальных клеток, изменяя ее проницаемость, что значительно препятствует переносу питательных веществ через мембраны микробных клеток. В то же время низкомолекулярные хитозаны способны проникать внутрь бактериальных клеток, повреждая целостность внешней мембраны и приводя к их гибели [2].

Целью настоящего исследования явилось определение гидрофобности и липидного состава мембран стафилококков с сопоставлением их чувствительности к хитозанам.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили выделенные по стандартной методике из продуктов питания коагулазонегативные и коллекционные штаммы стафилококков *S.aureus* ATCC 25923 и *S.cohnii* VKM В-3165. В работе были использованы любезно предоставленные зав. лабораторией инженерии биополимеров центра «Биоинженерия» РАН В.П. Варламовым кватернизированные хитозаны (квХ) со степенями замещения (СЗ) 60 и 100 %, полученные модифицированием высокомолекулярного (200 кДа) крабового хитозана. Бактерии культивировали в колбах на среде LB, содержащей, г/л: триптон (Panreac, Испания) – 10, дрожжевой экстракт (Becton, Dickinson and Company, США) – 5, KCl («Вектон», Россия) – 6,4, pH = 7,2, на орбитальном шейкере при 150 об/мин и температуре 37 °С.

Гидрофобность клеток оценивали по распределению их между фазами воды и гексадекана по методу ВАТН [3]. Экстракцию липидов бактерий проводили по модифицированному методу Блайя и Дайэра [4] с дальнейшим разделением их тонкослойной хроматографией (ТСХ) на пластинах Sorbfil («Сорбполимер», Россия) в смеси растворителей «хлороформ – метанол – вода» в объемном соотношении 65:25:4. Для идентификации индивидуальных липидов использовали специфические детекторы функциональных групп и сравнение с факторами подвижности маркерных липидов [5].

Чувствительность бактерий к хитозанам определяли методом серийных разведений в бульоне LB без KCl в иммунологических 96-луночных полистироловых планшетах. Максимальные разведения препаратов, при которых отсутствовал рост бактерий, принимали как их минимальные ингибиторные концентрации (МИК).

Для оценки статистической значимости влияния показателей гидрофобности и наличия в мембранах лизилфосфатидилглицерина на величину МИК квХ 100 % использовалась корреляционная матрица, по результатам которой был проведен регрессионный анализ. Обработка данных проводилась с использованием языка программирования R.

Результаты и их обсуждение

Результаты экспериментов по связыванию бактериальных клеток с гексадеканом позволили разделить изучаемые штаммы бактерий на несколько категорий: обладающие гидрофильной поверхностью – изоляты №№ 6, 7, 9 и 10; слабо гидрофобной – №№ 4 и 8; гидрофобной – *S.cohnii* и №№ 11 и 14 и строго гидрофобной – *S.aureus* (таблица).

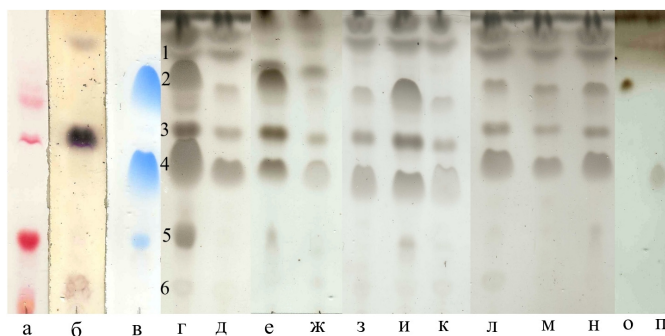


Рис. ТСХ липидов стафилококков: 1 – гликолипид, 2 – кардиолипин, 3 – гликолипид, 4 – фосфатидилглицерин, 5 – лизилфосфатидилглицерин, 6 – гликолипид; специфическое окрашивание липидов *S.aureus*: а – на аминокруппы, б – сахар, в – фосфор; неспецифическое окрашивание на все липиды: г – *S.aureus*, д – *S.cohnii*, е – № 4, ж – № 6, з – № 7, и – № 8, к – № 9, л – № 10, м – № 11, н – № 14; маркеры: о – кардиолипин, п – фосфатидилглицерин

Сравнительный анализ качественного состава полярных липидов изученных штаммов стафилококков, представленный на рисунке, показал наличие фосфолипидов кардиолипина, фосфатидилглицерина и лизилфосфатидилглицерина (лизилФГ), а также гликолипидов в клетках бактерий *S.aureus*. В то же время состав липидов бактерий *S.cohnii* характеризовался отсутствием лизилФГ.

Этот фосфолипид, однако, в значительно меньших количествах, по сравнению с таковыми бактерий *S.aureus*, выявлялся в липидных спектрах изолятов №№ 4, 8 и 14.

Ранее нами предполагалось, что гидрофильные положительно заряженные молекулы хитозанов должны обладать большим сродством с наименее гидрофобными и наиболее отрицательно заряженными, не имеющими в мембранах положительно заряженного фосфолипида лизилФГ клетками стафилококков, что приводило бы к более выраженному их антибактериальному действию в отношении атакуемых микроорганизмов. Однако установленные значения МИК квХ 100 % против изученных штаммов стафилококков, представленные в таблице, находятся в ряду от 15,6 до 62,5 мкг/мл, т.е. в пределах ошибки двукратных разведений.

Показатели гидрофобности, обнаружение лизилФГ
и чувствительность стафилококков к хитозанам

Характеристика	Штаммы									
	<i>S.cohnii</i>	<i>S.aureus</i>	4	6	7	8	9	10	11	14
Гидрофобность, %	29,0	90,3	13,3	0	0	16,9	3,5	2,7	43,7	24,3
МИК квХ 100 %, мкг/мл	15,6	62,5	31,25	15,6	31,25	15,6	31,25	31,25	31,25	31,25
МИК квХ 60 %, мкг/мл	31,25	125	62,5	31,25	62,5	31,25	62,5	31,25	62,5	62,5
ЛизилФГ	–	+	+	–	–	+	–	–	–	+

Тем не менее регрессионный анализ данных показал, что отсутствие лизилФГ в мембранах большинства изученных штаммов стафилококков значимо влияет на повышение МИК квХ 100 %.

Важно отметить, что МИК квХ 60 % для этих бактерий двукратно возрастает (см. таблицу). Таким образом, максимальная СЗ хитозана, приводящая к увеличению положительного заряда молекулы, способствует увеличению антибактериального эффекта на клетки стафилококков.

Выводы

Обнаружена достоверная зависимость степени чувствительности стафилококков к квХ 100 % от наличия в их мембранах лизилФГ. По-видимому, наибольший вклад в проявление чувстви-

ности клеток стафилококков к высокомолекулярным кватернизированным хитозанам вносит их электростатическое взаимодействие.

Список литературы

1. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты / В.П. Варламов, Б.Ц. Шагдарова, А.П. Луньков, И.С. Мысякина // Успехи биологической химии. – 2020. – Т. 60. – С. 317–368.
2. Антибактериальное действие низкомолекулярного хитозана в отношении *Escherichia coli* / С.Н. Куликов, Д.Р. Оберемок, Е.А. Безродных, В.Е. Тихонов, В.П. Варламов // Ученые записки Казанского Университета. – 2013. – Т. 155, № 3.– С. 27–39.
3. Reifsteck F., Wee S., Wilklnson B.J. Hydrophobicity-hydrophilicity of staphylococci // J. Med. Microbiol. – 1987. – Vol. 24. – P. 65–73.
4. Bligh E.G, Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. – 1959. – Vol. 37, no. 8. – P. 911–917.
5. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. – М.: Мир, 1975. – 326 с.

Об авторах

Дьячкова Валерия Аркадьевна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: lerichna3004@gmail.com.

Кононова Людмила Ивановна – ведущий инженер лаборатории биохимии развития микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, e-mail: kononova_l@iegm.ru.

Пьянков Иван Алексеевич – студент, Санкт-Петербургский государственный университет, e-mail: vanupyankov@gmail.com.

Коробов Владимир Павлович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, заведующий лабораторией биохимии развития микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, e-mail: korobov@iegm.ru.

В.В. Егорова, Ю.Г. Максимова

**ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ
НА ОСНОВЕ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ С ЛИПАЗНОЙ
И АМИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

Посвящена иммобилизации клеток алкалотолерантных солеустойчивых микроорганизмов *Pseudomonas peli* и *Microbacterium kitamiense*, обладающих липазной и амилазной активностью соответственно. Реализованы различные методики получения иммобилизованных биокатализаторов: адсорбция на нерастворимом носителе, включение в структуру геля. Определена ферментативная активность микроорганизмов в свободном и иммобилизованном состоянии, операционная стабильность ряда биокатализаторов.

Ключевые слова: биокатализ, иммобилизация, иммобилизованные клетки, липазы, амилазы, ферменты, активность ферментов, промышленная биотехнология.

V.V. Egorova, Y.G. Maksimova

**IMMOBILIZED BIOCATALYSTS BASED ON BACTERIA
STRAINS WITH LIPASE AND AMYLASE ACTIVITY**

The work refers to the immobilization of alkalotolerant salt-stable microorganisms cells *Pseudomonas peli* and *Microbacterium kitamiense*, which have lipase and amylase activity. Various methods of obtaining immobilized biocatalysts were implemented: adsorption on an insoluble carrier, inclusion in the gel structure. The enzymatic activity of microorganisms in the free and immobilized state, the operational stability of some biocatalysts were determined.

Keywords: biocatalysis, immobilization, immobilized cells, lipases, amylases, enzymes, enzyme activity, industrial biotechnology.

Теоретические сведения

Одна из основных задач биотехнологии состоит в разработке подходов, которые способствуют повышению эффективности и рентабельности биосинтеза с применением биологических систем [4]. Примерами этого являются методы иммобилизации клеток, т.е. закрепление их на нерастворимом носителе. Это дает возможность воспользоваться преимуществами гетерогенного катализатора

(в данном случае биокатализатора) над гомогенным. Актуальным примером использования иммобилизованных клеток может служить получение внеклеточных ферментов (липазы, протеазы, амилазы, целлюлазы и т.д.), а также использование биокатализаторов с целью биodeградации различных субстратов.

Липазы – внеклеточные ферменты, катализирующие реакции обратимого гидролиза триацилглицеролипидов до глицерина и жирных кислот. Сегодня липазы нашли широкое применение в реакциях гидролиза, этерификации и переэтерификации различных соединений. Разнообразие свойств и специфичности данных ферментов позволяет использовать их в различных видах промышленности [1].

Группа α -амилаз представляет собой ряд ферментов, которые действуют на крахмал со стороны α -гликозидного гидроксила, гидролизуя (α -1-4)- и(или) (α -1-6)-связи с образованием олиго- и моносахаридов [2]. Основное направление использования амилалитических ферментов – промышленный гидролиз крахмала с целью получения глюкозного сиропа (инверсия крахмала) [2, 3].

Методы исследования

Физическая иммобилизация на каолине. Клетки отделили от культуральной жидкости методом центрифугирования, 10 мл суспензии клеток объединили с 0,5 г каолина и инкубировали на шейкере 60 мин. Полученную смесь отфильтровали через бумажный фильтр «Синяя лента» и определили массу адгезированных клеток А(мг) по формуле:

$$A = mV \frac{ОП_{исх} - ОП_{фильтрат} - ОП_{смыв}}{ОП_{исх}}.$$

где V – объем, мл; $ОП_{исх}$ – оптическая плотность клеток в буферном растворе; $ОП_{фильтрат}$ – оптическая плотность фильтрата; $ОП_{смыв}$ – оптическая плотность смыва остатков жидкой фазы с биокатализатора.

Иммобилизация клеток включением в агарозный гель. Суспензию клеток в буферном растворе объединили с жидким 4%-ным раствором агарозы перед его гелеобразованием, разлили по стерильным чашкам Петри. После застывания геля измельчили агарозную пластину.

Иммобилизация клеток включением в структуру альгинатного геля. Клеточную суспензию объединили со стерильным раствором альгината в соотношении 1:2, через шприц для подкожных инъекций объемом 1 мл накапали в холодный 0,1М раствор BaCl_2 . Полученные гранулы шарообразной формы ресуспендировали в растворе BaCl_2 в течение 24 ч при 4–6 °С. Перед использованием отмыли гранулы дистиллированной водой.

Определение липазной активности клеток. Для определения липолитической активности изолятов, выращенных на селективной среде Пфеннига с Tween-80, проводили биохимическую реакцию с р-нитрофениллауратом, который под действием липазы расщеплялся с образованием окрашенного продукта р-нитрофенола. Активность липазы определяли по приросту оптической плотности среды при $\lambda = 405$ нм, измеренной на спектрофотометре Ultraspec 3000 GE Healthcare (США). Расчет липолитической активности E (мкмоль/мг/мин) проводили по формуле:

$$E = \frac{V_1 \cdot 10^6 \cdot \text{ОП}}{V_2 \cdot 18,3 \cdot 10^3 \cdot l \cdot t \cdot m},$$

V_1 , V_2 – конечный и начальный объем пробы соответственно; $18,3 \cdot 10^3$ – коэффициент молярной экстинкции рNP; l – толщина кюветы; ОП – оптическая плотность реакционной смеси; t – время инкубирования на момент измерения ОП, мин; m – масса клеток в реакционной смеси, мг.

Определение амилолитической активности клеток. Активность амилазы оценивали с помощью коммерческого набора реактивов Альфа-Амилаза-Ольвекс ООО «Ольвекс Диагностикум» (Россия). Реакция основана на гидролизе синтетического субстрата EPS [4,6-этилиден($G7$)-р-нитрофенил-($G1$)- α , D-мальтогептозид] с образованием нитрофенилмальтозидов, которые подвергаются дальнейшему расщеплению альфа-глюкозидазой до глюкозы и окрашенного продукта р-нитрофенола. Активность фермента определяли по изменению оптической плотности среды при $\lambda = 405$ нм на планшетном ридере Infinite M1000 Tecan (Швейцария) в течение пяти циклов с интервалом в 1 мин. Расчет проводили через коэффициент молярной экстинкции рNP по формуле (1).

Результаты и их обсуждение

При адсорбции клеток на каолине получили биокатализатор белого цвета, принимающий пастообразную консистенцию при впитывании влаги. Определили величину адсорбции бактериальных клеток на каолине. Клетки *P. peli* 1 наиболее эффективно сорбируются на каолине. Величина адсорбции составляет 42,64 мг клеток/г носителя при концентрации суспензии клеток 2,2 мг/мл. Клетки родственного штамма (*P. peli* 2) сорбируются меньше – 33,02 мг клеток/г при концентрации суспензии 4,0 мг/мл.

Провели иммобилизацию клеток методом включения в полимерную сетку агарозного и альгинатного гелей. Первый представляет собой белые полупрозрачные гранулы в виде пластин, второй – гранулы шарообразной формы (рис. 1).



Рис. 1. Биокатализаторы на основе агарозного (а) и альгинатного (б) гелей

Сравнили активность клеток *E* в свободном и иммобилизованном состояниях (таблица). Биокатализаторы на основе *M. kitamiense* оказались неактивными из-за затрудненного массообмена молекул субстрата EPS через поры геля.

Вывод: на каолине предпочтительно проводить иммобилизацию штамма *P. peli* 2, биокатализатор с каолином в качестве носителя обладает сравнительно высокой долей сохранения активности (55,6 % против 40 %). Биокатализаторы на основе гелей можно назвать более простыми в использовании, однако они более трудоемкие в приготовлении.

Для биокатализаторов на основе агарозного геля проверили операционную стабильность. Осуществили 5 циклов реакции с интервалом в 1 ч, приняли липазную активность первой реакции за 100 % (рис. 2).

Активность клеток в свободном и иммобилизованном состоянии

Штамм/фермент	<i>P. peli</i> 1 / липаза	<i>P. peli</i> 2 / липаза	<i>M. kitamience</i> / амилаза
Свободные клетки			
<i>E</i> , мкмоль/мг/мин	0,940	0,968	1,590193
Клетки, иммобилизованные на каолине			
<i>E</i> , мкмоль/мг/мин	0,376 (40 %)	0,429 (55,6 %)	–
Клетки, включенные в структуру агарозного геля			
<i>E</i> , мкмоль/мг/мин	0,446 (48 %)	0,43 (44,8 %)	0
Клетки, включенные в структуру альгинатного геля			
<i>E</i> , мкмоль/мг/мин	0,446 (47 %)	–	0

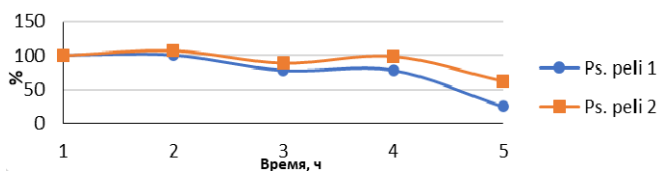


Рис. 2. Операционная стабильность липазных
биокатализаторов на основе агарозы

Биокатализатор на основе клеток *P. peli* 2 отличается более высокой стабильностью. После 5 циклов реакций иммобилизованные клетки *P. peli* 1 сохраняли 25,2 % исходной активности, *P. peli* 2 – 61,6 %.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта «Получение препаратов для сельского хозяйства на основе клеток и ферментов микроорганизмов экстремальных экосистем».

Список литературы

1. Безбородов А.М., Загустина Н.А. Липазы в реакциях катализа в органическом синтезе (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50, № 4. – С. 313–347.
2. Никитина Е.В., Решетник О.А., Губайдуллин Р.А. Биотехнологические аспекты применения амилаолитических ферментов в пищевой промышленности // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – № 13. – С. 148–153.

3. Самойлова Ю.В., Сорокина К.Н., Пармон В.Н. Перспективы применения ферментативной переэтерификации масел для получения модифицированных жиров // Катализ в промышленности. – 2016. – Т. 16, № 3. – С. 57–63.

4. Имобилизованные клетки микроорганизмов / А.П. Синицын, Е.И. Райнина, В.И. Лозинский, С.Д. Спасов. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 288 с.

5. Chandorkar V., Gomashe A.V., Parlewar S. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger* // International Journal of Current and Microbiology and Applied Sciences. – 2014. – No. 3. – P. 703–707.

Об авторах

Егорова Виктория Владимировна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: tory77707@gmail.com.

Максимова Юлия Геннадьевна – ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, e-mail: yul_max@mail.ru.

У.А. Елизарова, Ю.А. Смятская

МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA* – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПРОДУЦЕНТ ЛИПИДОВ С ВЫСОКИМ СПЕКТРОМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Представлены краткая характеристика и назначение биомассы микроводоросли *Chlorella*. Рассмотрена одна из современных проблем биотехнологии, связанная с поиском соединений, имеющих высокий спектр биологической активности и полезные свойства. Биомасса микроводоросли *Chlorella* – перспективный природный источник биологически активных соединений, что подтверждают данные, полученные с помощью онлайн-сервиса PASS. PASS Online прогнозирует более 4000 видов биологической активности, включая фармакологические эффекты, механизмы действия, токсические и побочные эффекты, взаимодействие с метаболическими ферментами и транспортерами, влияние на экспрессию генов и другие на основе структурной формулы соединения. Проведен расчет биологической активности для компонентов жирно-кислотного состава суммы липидов, полученной из биомассы микроводорослей *Chlorella*.

Ключевые слова: микроводоросль *Chlorella*, биомасса, биологическая активность, биотехнология, онлайн-сервис PASS, жирно-кислотный состав суммы липидов.

U.A. Elizarova, Y.A. Smyatskaya

MICROALGAE CHLORELLA – A PROMISING PRODUCER OF LIPIDS WITH A HIGH SPECTRUM OF BIOLOGICAL ACTIVITY

A brief description and purpose of the biomass of the microalgae *Chlorella* are presented. One of the modern problems of biotechnology related to the search for compounds with a high range of biological activity and useful properties is considered. The biomass of the microalgae *Chlorella* is a promising natural source of biologically active compounds, which is confirmed by the data obtained using the online service "PASS". PASS Online predicts more than 4000 types of biological activity, including pharmacological effects, mechanisms of action, toxic and side effects, interactions with metabolic enzymes and transporters, effects on gene expression, etc. based on the structural formula of the compound. The calculation of the biological activity for the components of the fatty acid composition of the sum of lipids obtained from the biomass of microalgae *Chlorella* was carried out.

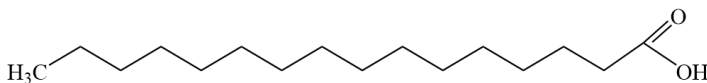
Keywords: microalgae *Chlorella*, biomass, biological activity, biotechnology, online service "PASS", fatty acid composition of the sum of lipids.

Актуальность проблемы поиска соединений, обладающих высоким спектром биологической активности из биомассы микроводорослей *Chlorella* высока, поскольку такие соединения становятся потенциальными объектами биотехнологического использования [1]. А саму биомассу микроводорослей *Chlorella* из-за наличия разных полезных свойств можно использовать в области медицины, пищевой промышленности, фармакологии, энергетики, сельского хозяйства. Развитие биотехнологии микроводорослей затрагивает ряд отраслей: производство фармакологически активных препаратов, продуктов для косметических аппликаций (антиоксиданты, противовоспалительные средства) и диетических продуктов, инженерии, технологию по оздоровлению окружающей среды. Актуальность проблемы поиска связи между химической структурой соединения и его характеристиками биологической активности высока, поскольку данная связь позволяет в какой-то степени прогнозировать последствия при попадании соединения в организм, в биосферу и способствует целенаправленному синтезу веществ с заданными свойствами. Ценность таких прогнозов весьма велика, поскольку они экономят большие средства, необходимые для установления соответствующих свойств экспериментальным путем.

Данные последних лет позволяют утверждать, что микроводоросли можно использовать для направленного биосинтеза целого ряда соединений. Микроводоросль *Chlorella* – комплекс из множества веществ: содержит в себе все незаменимые аминокислоты, жиры, жирные кислоты, пигменты (каротиноиды, флавоноиды), витамины, микро- и макроэлементы, находящиеся в сбалансированном и легко усвояемом виде. Таким образом, биомасса микроводоросли является перспективным источником БАВ. Биологическую активность проявляют как продукты первичного метаболизма микроводорослей (белки, углеводы, липиды, жирные кислоты и витамины), так и вторичные метаболиты, имеющие противогрибковую, противовирусную, альгоцидную, антиэнзиматическую или антибиотическую активность [2]. Специфика метаболизма представителей микроальгофлоры, связанная с продуцированием метаболитов с ценными для человека свойствами, сделала микроводоросли одним из важных объектов биотехнологии. Биомассу микроводорослей можно получить, выращивая ее в промышленных фотобиореакторах различного типа [3].

В биомассе микроводорослей *Chlorella vulgaris* наблюдается повышенное количество компонентов жирно-кислотного состава суммы липидов, поэтому с помощью онлайн-сервиса PASS выполнен расчет прогнозируемых спектров биологической активности для компонентов с большей концентрацией в данном составе. В качестве выходной информации получается список прогнозируемых видов активности с оценками вероятности наличия каждого вида активности P_a и вероятности отсутствия каждого вида активности P_i , которые могут принимать значения в диапазоне от нуля до единицы [4]. Выбрано несколько видов активностей, у которых вероятность отсутствия (P_i) самая низкая, а вероятность наличия среди высоких значений.

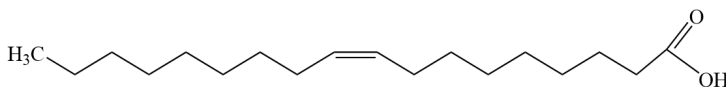
• Прогнозируемый спектр активности для пальмитиновой кислоты:



1) $P_a = 0,973$; $P_i = 0,001$, как ингибитор ацилкарнитин гидролазы;

2) $P_a = 0,966$; $P_i = 0,001$, как ингибитор алкилацетилглицерофосфатазы и т.д. по данным компьютерного прогнозирования.

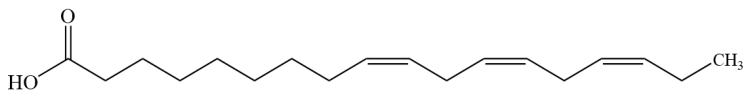
• Прогнозируемый спектр активности для C 18:1 *n*9 cis олеиновой кислоты:



1) $P_a = 0,974$; $P_i = 0,001$, как субстрат CYP2J;

2) $P_a = 0,900$; $P_i = 0,001$, как ингибитор лейкотриен-В4 20-монооксигеназы и т.д., по данным компьютерного прогнозирования.

• Прогнозируемый спектр активности для C 18:3 *n*3α линоленовой кислоты:



1) $P_a = 0,971$; $P_i = 0,001$, как субстрат CYP2J;

2) $P_a = 0,937$; $P_i = 0,001$, как ингибитор фосфатидилглицерофосфатазы и т.д., по данным компьютерного прогнозирования.

Таким образом, биомасса микроводорослей *Chlorella* – перспективный продуцент липидов с высоким спектром биологической активности их компонентов, что подтверждают данные, полученные с помощью компьютерного прогнозирования.

Список литературы

1. Жирнокислотный состав коккоидных зеленых водорослей как основа их энергосырьевого потенциала. 1. *Chlorella*- и *Acutodesmus*-подобные микроводоросли (Chlorophyta) / П.М. Царенко, М.А. Конищук, В.И. Корховой, И.Ю. Костиков, Я.Б. Блюм // Альгология. – 2017. – Т. 27, № 4. – С. 382–402.

2. Калинин С.Ю., Смыкалова А.С., Ворслов Л.О. Препараты на основе бурых водорослей: биологические свойства, возможности применения в медицине и диетологии / медико-стоматологический ун-т им. А.И. Евдокимова. – М., 2019. – Т. 9, № 1. – С. 25–32.

3. Водоросли: Цианобактерии, красные, зеленые и харовые водоросли: учеб.-метод. пособие / А.Г. Пауков, А.Ю. Тептина, Н.А. Кутлунина, А.С. Шахматов, Е.В. Павловский. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017. – 204 с.

4. Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса PASS ONLINE / Д.А. Филимонов, А.А. Лагунин, Т.А. Глориозова, А.В. Рудик, Д.С. Дружиловский, П.В. Погодин, В.В. Поройков // Химия гетероциклических соединений. – 2014. – № 3. – С. 483–499.

Об авторах

Елизарова Ульяна Андреевна – магистрант ВШБиПП ИБСиБ, Санкт-Петербургский государственный политехнический университет Петра Великого, e-mail: elizarova.ua@edu.spbstu.ru.

Смятская Юлия Александровна – кандидат технических наук, доцент ВШБиПП ИБСиБ, Санкт-Петербургский государственный политехнический университет Петра Великого, e-mail: smyatskaya_yua@spbstu.ru.

И.В. Желнина, О.И. Бахирева

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА ВОДЫ ОТ ИОНОВ КОБАЛЬТА

Известны методы биотехнологической очистки воды от ионов тяжелых металлов, в том числе ионов кобальта, с применением микроорганизмов. Применяли культуру аэробных микроорганизмов, поддерживающую активную жизнедеятельность в присутствии высоких концентраций ионов кобальта, которая была выделена из почвы, загрязненной ионами тяжелых металлов. Для исследуемой культуры был проведен диско-диффузионный метод, показывающий толерантность культуры к извлекаемым ионам, построены кривые роста и определен диапазон pH, являющийся благоприятным для роста культуры.

Ключевые слова: вода, ионы кобальта, культура микроорганизмов, толерантность, кривая роста, pH, биотехнологическая очистка.

I.V. Zhelnina, O.I. Bakhireva

BIOTECH WATER PURIFICATION FROM IONS OF COBALT

There are known methods of biotechnological water purification from heavy metal ions, including cobalt ions, using microorganisms. In this work, we used a culture of aerobic microorganisms that supports active life in the presence of high concentrations of cobalt ions, which was isolated from soil contaminated with heavy metal ions. For the studied culture, a disc-diffusion method was performed, showing the tolerance of the culture to the extracted ions, growth curves were constructed, and the pH range that is favorable for the growth of the culture was determined.

Keywords: water, cobalt ions, culture of microorganisms, tolerance, growth curve, pH, biotechnological purification.

Одним из сильнейших по действию и наиболее распространенным химическим загрязнением является загрязнение тяжелыми металлами. Очистка от тяжелых металлов – это удаление из питьевой и промышленной воды, почвы солей тяжелых металлов. Основная проблема в процессе очистки заключается в том, что соли тяжелых металлов объединяются в соединения, являющиеся довольно стойкими, устранять которые довольно трудно [1].

Ионы кобальта оказываются в воде чаще всего в результате процессов выщелачивания их из медноколчеданных и других руд, из почв при разложении организмов и растений, а также со сточ-

ными водами металлургических, металлообрабатывающих и химических заводов из-за расположенных рядом с источниками производственных мощностей.

Для очистки воды от ионов кобальта в работе применяли культуру микроорганизмов, выделенную из почвы, загрязненную ионами тяжелых металлов. Культура представлена грамотрицательными диплококками [2].

При помощи диско-диффузионного метода в диапазоне концентраций от 5 до 1000 мг/л определена толерантность выделенной культуры микроорганизмов к ионам кобальта. Активный рост культуры микроорганизмов наблюдался при концентрациях: 5, 10, 25, 50 мг/л. Концентрация 100 мг/л приводит лишь к незначительному угнетению роста культуры, дальнейшее увеличение концентрации до 1000 мг/л к гибели микроорганизмов не приводило. Это указывает на то, что данные концентрации ионов кобальта благоприятны для культуры и она активно растет независимо от их присутствия в питательной среде [3].

Изучение скорости роста культуры микроорганизмов проводили в присутствии ионов кобальта в концентрации 100 мг/л и без его добавления (рис. 1).

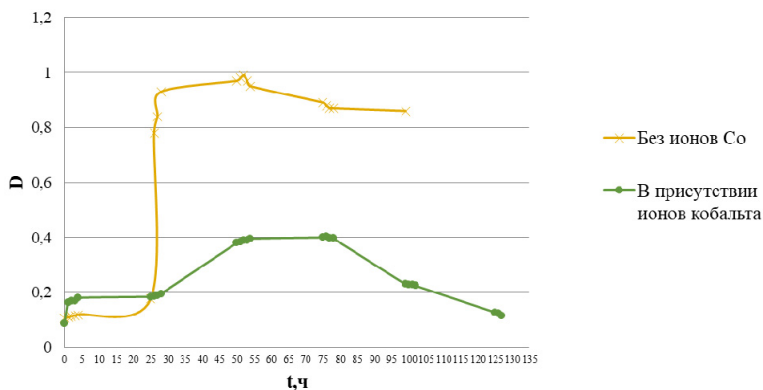


Рис. 1. Кривая роста культуры микроорганизмов

Скорости роста культуры микроорганизмов в логарифмической фазе, характеризующие максимальные постоянные скорости размножения микроорганизмов (от 20 до 45 ч в данном случае, см. рис. 1) составили:

- без добавления $\text{Co}^{2+} - 0,377 \text{ ч}^{-1}$;
- с добавлением $\text{Co}^{2+} - 0,0319 \text{ ч}^{-1}$.

Культура микроорганизмов в лаг-фазе растет быстрее в присутствии ионов кобальта, чем без них. Это, по-видимому, связано с биогенными свойствами ионов кобальта, и их накопление в клетках до определенного предела способствует более быстрому начальному росту культуры. Однако в экспоненциальной или логарифмической фазе замедление скорости роста с $0,377$ до $0,0319 \text{ ч}^{-1}$ практически на порядок показывает, что дальнейшее накопление в клетках ионов кобальта является избыточным и ингибирует процесс роста (рис. 1).

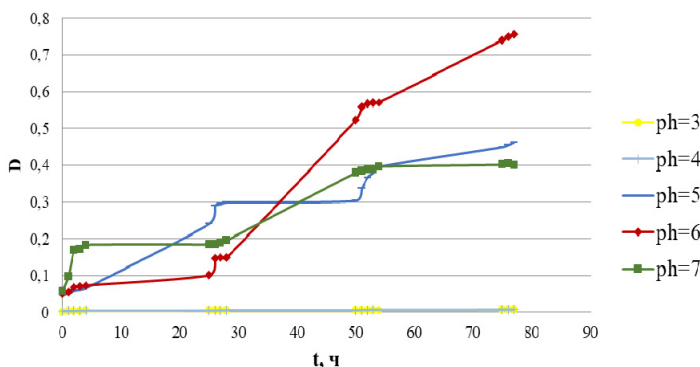


Рис. 2. Кривые роста культуры микроорганизмов в питательной среде в присутствии ионов кобальта ($C = 100 \text{ мг/л}$) при различных значениях pH

Влияние pH на скорость роста культуры микроорганизмов оценивали в диапазоне от 4 до 7 (рис. 2). Исходная питательная среда имеет $\text{pH} = 7,1$, подкисление питательной среды проводили $0,1 \text{ Н}$ соляной кислотой для достижения необходимых значений pH. Отмечено, что по мере роста микроорганизмов происходит небольшое подщелачивание среды, поэтому является вполне логичным, что питательная среда в присутствии ионов кобальта в концентрации 100 мг/л с $\text{pH} = 6$ является благоприятной и оптимальной и для роста культуры микроорганизмов.

Скорости роста при $\text{pH} = 3$ и $\text{pH} = 4$ снижаются значительно, появление катионов водорода ингибирует рост микроорганизмов при $\text{pH} = 3$ до $0,0069 \text{ ч}^{-1}$, при $\text{pH} = 4$ до $0,0097 \text{ ч}^{-1}$. Питательные

среды с $pH = 3$ и $pH = 4$ не являются благоприятными, и в кислой среде процесс поглощения ионов кобальта данной культурой микроорганизмов проводить не рекомендуется.

Изученные характеристики культуры микроорганизмов – толерантность к ионам кобальта, зависимость скорости роста от различных факторов показывают, что данную культуру микроорганизмов можно применять для очистки воды от ионов кобальта.

Список литературы

1. Водяницкий Ю.Н., Васильев А.А., Лобанова Е.С. Загрязнение тяжелыми металлами и металлоидами почв г. Перми // Агрохимия. – 2009. – № 4. – С. 60–68.
2. Микробиологический метод очистки почв от ионов тяжелых металлов: Pb^{2+} , Hg^{2+} и Co^{2+} / О.В. Махрова, О.И. Бахирева, М.М. Соколова // Химия. Экология. Биотехнология – 2015: тез. докл. XVII регион. науч.-практ. конф. студ. и молодых ученых. – Пермь, 2015. – С. 111–112.
3. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология и практика: в 2 ч. Ч. 1: Учебник для бакалавриата и магистратуры. – М.: Изд-во Юрайт, 2017. – 315 с. – Сер.: Бакалавр и магистр. Академический курс.
4. Концевая И.И. Микробиология: культивирование и рост бактерий. Практическое руководство для студ. биологич. спец. вузов / Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Чернигов: Десна Полиграф, 2017. – 44 с.
5. Бахирева О.И., Федорова М.С., Басов В.Н. Изучение возможности применения микробиологической очистки природных вод от ионов стронция в присутствии ионов кальция // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология. – 2013. – № 1. – С. 117–126.

Об авторах

Желнина Ирина Владимировна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: ir.jelnina@yandex.ru.

Бахирева Ольга Ивановна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: bahirevy@mail.ru.

Г.З. Ибрагимова, Н.Б. Ходяшев

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ КУЛЬТУРЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ КОЗЬЕГО МОЛОКА

Выделены культуры молочнокислых бактерий из свежего и кислого козьего молока. Приведено морфологическое описание колоний и идентификация культуры в соответствии с полученными данными.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, выделение, козье молоко.

G.Z. Ibragimova, N.B. Khodyashev

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA CULTURE FROM GOAT'S MILK

Culture of lactic acid bacteria isolated from fresh and sour goat's milk. The morphological description of the colonies and identification of the culture are given in accordance with the data obtained.

Keywords: lactic acid bacteria, separation, goat milk.

Молочнокислые бактерии – это группа микроорганизмов, которая сбраживает углеводы с образованием молочной кислоты [1].

Данные бактерии неподвижны, не образуют спор, капсул, положительно окрашиваются по Граму. По форме клеток молочнокислые бактерии представляют собой кокки сферической или эллипсоидной формы и палочки разной длины и формы.

Источниками для выделения лактококков служат кисломолочные продукты (сметана, простокваша, сыры, кефир и др.), лактобацилл – силос, травы, пищевые продукты [2].

Материалы и методы исследования

В качестве источников для выделения молочнокислых бактерий использовали свежее и кислое (выдерживали 4 суток при комнатной температуре) козье молоко из с. Барда Бардымского района.

В процессе культивирования использовали питательную среду, содержащую питательную основу (панкреатический гидролизат казеина, полисорбат-80, натрий углекислый, агар бактериологический),

лактозу, глюкозу, экстракт дрожжевой [3]. Идентификация роста молочнокислых бактерий возможна за счет наличия в составе среды кислотно-основного индикатора – бромкрезолового пурпурового, обеспечивающего изменение окраски среды с пурпурного на желтый.

Для получения изолированных колоний микроорганизмов использовали метод Коха [2]. Культивирование осуществляли в течение 5 суток в термостате при температуре 30 °С.

Полученные колонии микроорганизмов подвергали окрашиванию с использованием водно-спиртового раствора кристаллвиолета и микроскопировали под иммерсионным объективом (общее увеличение – x100).

Результаты и их обсуждение

Морфологическое описание колоний, выделенных из свежего козьего молока: форма – округлая; размер – 1–3 мм; оптические свойства – полупрозрачная; цвет – молочный; поверхность – гладкая; профиль – выпуклый; край – ровный; структура – однородная; консистенция – тестообразная; способность к эмульгированию – равномерная суспензия в воде.

Морфологическое описание колоний, выделенных из кислого козьего молока: форма – округлая; размер – 1–4 мм; оптические свойства – непрозрачная; цвет – желтый; поверхность – гладкая; профиль – выпуклый; край – ровный; структура – однородная; консистенция – тестообразная; способность к эмульгированию – равномерная суспензия в воде.

По морфологическим особенностям колонии отличаются друг от друга, следовательно, были выделены разные культуры (рисунок).

В ходе микроскопирования было обнаружено, что клетки, выделенные из свежего молока, представлены кокками сферической или овальной формы, располагаются в виде диплококков или коротких цепочек. Согласно литературным данным и определителю бактерий Берджи, можно предположить, что выделилась культура *Lactococcus lactis subspecies lactis* [4, 5].

Клетки, выделенные из кислого молока, представлены кокками овальной и шаровидной формы более крупного размера, часто соединены в цепочки. Можно сделать предположение, что выделилась культура *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* [4, 5].

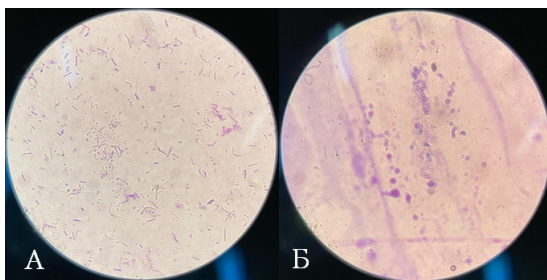


Рис. Окрашенные микропрепараты колоний микроорганизмов из свежего (а) и кислого (б) молока

Сопоставление морфологических особенностей колоний микроорганизмов и результаты микроскопирования позволяют сделать предположения о видах выделенных культур. Для точной идентификации необходимо использование молекулярно-генетических методов.

Выводы

1. Выделены культуры молочнокислых бактерий с использованием свежего и кислого козьего молока.
2. Приведено морфологическое описание колоний и результаты их микроскопирования.
3. Сделаны предположения, что выделенными культурами являются *Lactococcus lactis subspecies lactis* и *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*.

Список литературы

1. Использование молочнокислых бактерий в биотехнологических процессах / Е.В. Светлакова, Н.А. Ожередова, М.Н. Вережкина, А.Н. Кононов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 559.
2. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. вузов / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук [и др.]; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
3. Питательная среда для выявления молочнокислых бактерий (варианты): пат. 2701343 Рос. Федерация / Подкопаев Я.В.,

Домотенко Л.В., Шепелин А.П. № 2018131490. – заявл. 03.09.18; опубл. 26.09.19, Бюл. № 27. 16 с.

4. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Смит [и др.]. – М.: Мир, 1997. – Т. 2. – 325 с.

5. Красникова Л.В., Гунькова П.И., Маркелова В.В. Микробиология молока и молочных продуктов: учеб.-метод. пособие / НИУ ИТМО; ИХиБТ. – СПб., 2013. – 85 с.

Об авторах

Ибрагимова Гулюза Захировна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: igu-2000@mail.ru.

Ходяшев Николай Борисович – доктор технических наук, заведующий кафедрой «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: nhodyashev@yandex.ru.

М.С. Иванов, А.В. Портнова

ПРИМЕНЕНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ СЛАБОАЛКОГОЛЬНЫХ НАПИТКОВ

Представлена краткая характеристика пива. Рассмотрена актуальность малотоннажного производства пивных напитков. Предложены некоторые альтернативные технологии для расширения ассортимента слабоалкогольных напитков.

Ключевые слова: пиво, пивной напиток, дрожжи, пивные дрожжи, брожение, пивоварение.

M.S. Ivanov, A.V. Portnova

APPLICATION OF ALTERNATIVE TECHNOLOGIES IN THE PRODUCTION OF BEER-LIKE LOW-ALCOHOL BEVERAGES

A brief description of the beer is presented. The relevance of low-tonnage production of beer is considered. Some alternative technologies for expanding the range of low-alcohol beverages are proposed.

Keywords: beer, beer drink, yeast, brewer's yeast, fermentation, brewing.

Данная тема актуальна в связи с стремительно растущим интересом к пивному производству и увеличением доли малотоннажных и локальных производств.

Пиво – пенистый напиток, полученный из пивоваренного солода, хмеля и/или хмелепродуктов и воды с применением или без применения зернопродуктов, сахаросодержащих продуктов в результате брожения пивного сусла, содержащий этиловый спирт, образовавшийся в процессе брожения сусла. Пиво производится без добавления этилового спирта.

Продуцентом в пивном производстве являются пивные дрожжи. В основном они классифицируются на дрожжи верхового и низового брожения, но также существуют различные виды дрожжей, по-разному влияющих на органолептические свойства продукта.

В настоящее время существует несколько десятков сортов пива, а различных рецептов приготовления можно насчитать более тысячи. Каждый пивовар стремится внести что-то новое в уже устоявшиеся технологии и получить свой, отличный от других, напиток.

В 2016 г. количество действующих в России пивоварен выросло до 861. Среди них: 34 крупных предприятия, 71 региональная пивоварня, 507 мини-пивзаводов / мини-пивоварен и 250 ресторанных пивоварен. Таким образом, с 2011 г. наблюдается рост общего количества пивоварен с перераспределением доли от крупных заводов к мини- и ресторанным пивоварням.

В 2020 г. уже насчитывалось 1285 предприятий, занимающихся производством пивной продукции [1].

Мелкие производства позволяют производить различные виды пива, менять технологию производства в короткие сроки, делать упор на качество, а не количество и предоставлять потребителю больший выбор и разнообразие на рынке пивных напитков.

По исследованию Mordor Intelligence совокупный среднегодовой темп роста (CAGR) пивной промышленности с 2020 до 2025 г. составит 6,2 % [2], а промышленности крафтового пива – 14,1 % [3].

В книгах и на тематических сайтах в интернете можно найти множество технологий производства пива разных подходов и сложностей. Рослее изучения нескольких технологий была выбрана наиболее простая и удобная из них для возможности реализации в условиях домашнего производства без специального оборудования.

Краткое описание использованной технологии получения суслу заключается в следующем. Для варки суслу используется металлическая емкость объемом 10–12 л. Используется вода питьевая, предварительно очищенная с помощью фильтра и подвергшаяся кипячению. Суслу помещается в нейлоновый мешок и затем в емкость для варки. Осахаривание суслу производится с одной температурной паузой при 72 °C в течение 90 мин. По завершении осахаривания суслу охлаждается до 25 °C для последующего сбраживания. Для протекания процесса брожения необходимы дрожжи, они помещаются в готовое суслу, которое является благоприятной средой для их роста. В ходе жизнедеятельности дрожжи производят сбраживание суслу, в результате которого из сахаров образуется преимущественно этиловый спирт и выделяется углекислый газ. Брожение осуществляется в стерильной закрытой таре с гидрозатвором в течение 7–10 дней [4]. Определение количества образовавшегося спирта производилось расчетным методом по убыли массы за счет выделения углекислого газа, а также с помощью спиртометра [5].

В качестве альтернативной технологии получения пива была предпринята попытка использовать дикие дрожжи для процесса брожения. Для этого производилось выделение дрожжевой культуры с поверхности ягод дикорастущей красной рябины. В ходе опытов с дикой культурой дрожжей был сделан вывод о трудоемкости процесса, низкой производительности по спирту и необходимости долгого процесса адаптации дрожжевой культуры.

Другим альтернативным вариантом технологии приготовления пива было рассмотрено сгущение напитка. В целях получения более плотного напитка было проверено действие нескольких загустителей, применяемых в пищевой промышленности: сорбит, агар-агар, пектин, желатин.

В ходе экспериментов выяснилось следующее:

- сорбит неэффективен для сгущения питьевых продуктов;
- агар-агар не пригоден для равномерного сгущения, он вызывает образование плотных коагулятов даже при малых концентрациях;
- желатин обладает аналогичным эффектом, как агар-агар, но еще менее эффективен;
- пектин с трудом растворяется и активируется.

Таким образом, попытка создать более густой пивной напиток не принесла положительных результатов.

На следующем этапе исследований была использована молочная сыворотка в качестве сырья для получения слабоалкогольного продукта брожения. Была предпринята попытка сбраживания молочной сыворотки пивными дрожжами. Поскольку сыворотка преимущественно содержит дисахарид лактозу, не сбраживаемую пивными дрожжами, предварительно необходимо осуществить разложение лактозы на моносахариды – глюкозу и галактозу. Для этого провели кислотный гидролиз с фосфорной кислотой, которая часто применяется в составе напитков. После проведения процесса гидролиза сыворотку подвергли брожению с участием пивных дрожжей. Однако в результате проведенного эксперимента не было обнаружено образования спирта. Сделан вывод о несостоятельности кислотного гидролиза в условиях опыта. Для разложения лактозы возможно в дальнейшем применить лактазную ферментную закваску.

Также в качестве субстратов для сбраживания были выбраны апельсиновый сок и экстракт кураги. Свежевыжатый апельсиновый

сок поставили на брожение с применением пивных дрожжей Fermentis "Safale S-04", предварительно при этом содержание сахара в нем было доведено до 10 %. Спустя несколько дней было обнаружено образование спирта на уровне 5 мас. %. Сделан вывод о перспективности использования апельсинового сока для получения слабоалкогольного напитка.

Для получения экстракта кураги производилось заваривание измельченной кураги в воде ($T = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$) для экстрагирования питательных веществ в течение 120 мин. Содержание углеводов в экстракте кураги составило порядка 15 %. В результате брожения экстракта кураги содержание спирта в полученном продукте составило 7 мас. %.

На основании проведенных исследований можно предложить альтернативные варианты получения слабоалкогольных напитков на основе нетрадиционного сырья растительного и животного происхождения. В дальнейшем предстоит провести более глубокое изучение условий получения и качества предлагаемых слабоалкогольных напитков.

Список литературы

1. Пивное дело: Пивное дело 1-2020. Российские производители пива (каталог/база данных). – URL: <https://pivnoe-delo.info/2020/04/27/pivnoe-delo-1-2020-rossijskie-proizvoditeli-piva-katalog-baza-dannyx/> (дата обращения: 06.02.2021).
2. Mordor Intelligence: Beer Market - Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2021–2026) – URL: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/beer-market> (accessed 06 February 2021).
3. Mordor Intelligence: Craft Beer Market – Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2021–2026) – URL: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/craft-beer-market> (accessed 06 February 2021).
4. Форум профессиональных самогонщиков, винокуров, виноделов, пивоваров и бондарей: сайт. – URL: <https://alcodistillers.ru/forum/> (дата обращения: 13.02.2020).
5. Основы биотехнологии: лаб. практикум / сост. А.В. Виноградова, А.В. Портнова, Е.Н. Анашкина. – Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2017. – 44 с.

Об авторах

Иванов Максим Станиславович – студент бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: maksivanov123@gmail.com.

Портнова Анна Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: annysky2002@mail.ru.

А.М. Игнатова, М.А. Землянова

ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА АЛЮМИНИЯ

Рассматривается вопрос оценки синергетического токсического воздействия наноразмерных частиц оксида алюминия в водных средах. Показано, что достоверная оценка экологической токсичности оксида алюминия достигается при комплексном подходе, подразумевающем установление ингибирующей способности частиц по отношению к тестовым водным организмам и адсорбционной способности по отношению к более опасным неорганическим соединениям, присутствующим в водоемах при наличии антропогенной нагрузки на окружающую среду.

Ключевые слова: оксид алюминия, нанотоксикология, экотоксикология, адсорбция, рост водорослей.

A.M. Ignatova, M.A. Zemlyanova

ESTIMATION OF ECOLOGICAL TOXICITY OF ALUMINUM OXIDE NANOPARTICLES

The paper considers the issue of assessing the synergistic toxic effect of nanosized aluminum oxide particles in aqueous media. It is shown that a reliable assessment of the ecological toxicity of aluminum oxide is achieved with an integrated approach that implies the establishment of the inhibitory ability of particles in relation to test aquatic organisms and the adsorption capacity in relation to more dangerous inorganic compounds present in water bodies, in the presence of an anthropogenic load on the environment.

Keywords: aluminum oxide, nanotoxicology, ecotoxicology, adsorption, algae growth.

Наночастицы оксида Al_2O_3 применяются в различных сферах промышленности в качестве носителя катализатора, диспергирующего агента, абразивного покрытия, компонента керамики, а также они входят в состав фармацевтических препаратов и косметических средств. Одним из новых направлений применения наноразмерных частиц Al_2O_3 является их использование в качестве коагулянта при очистке сточных вод, а также в качестве компонента очистных составов для удаления органических веществ при обработке сточных

вод [1]. В результате широкого распространения наноразмерные частицы Al_2O_3 повсеместно проникают в окружающую среду, в особенности в водную среду. Доказано, что они оказывают токсическое действие на водные организмы, такие как бактерии, зоопланктон и фитопланктон [2, 3].

Известно также о том, что наноразмерные частицы Al_2O_3 при попадании в водную среду могут взаимодействовать с другими неорганическими загрязнителями воды, в частности с тяжелыми металлами, их солями и другими соединениями. Это взаимодействие может привести к малопрогнозируемым негативным экологическим последствиям. Анализ научно-технической литературы показывает возрастающее беспокойство исследователей о том, какой синергетический токсический эффект вызывают наночастицы оксида алюминия в окружающей среде. Поиск методик, позволяющих достоверно оценить синергетическое токсическое действие частиц оксида алюминия в окружающей среде, является актуальной проблемой.

Цель исследования – выявить эффективные методики оценки экологической токсичности наночастиц оксида алюминия.

В совокупности методики оценки экологической токсичности наночастиц оксида алюминия можно разделить на две группы: оценка ингибирующей способности по отношению к росту индикаторных водных организмов и оценка адсорбционной способности частиц по отношению к другим примесным соединениям в водной среде.

Согласно многочисленным исследованиям, предпочтительным тестовым водным организмом является зеленый водоросль *Scenedesmus obliquus*. Клетки этих водорослей рекомендуется культивировать в среде BG11 при температуре $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ и освещенности 7300 люкс в цикле свет – темнота 12:12. Для оценки на токсичность водоросли используются по достижении фазы среднего экспоненциального роста. На водоросли следует оказывать воздействие водными растворами наноразмерных частиц оксида алюминия с концентрацией не менее 1 мг/л. В исследованиях [4] указано, что рекомендовано оценивать токсический эффект спустя 24, 48 и 72 ч с момента воздействия. Измерение роста водорослей может оцениваться различными методиками, однако наиболее точной является спектрофотометрия при длине волны 650 нм. Для количественной оценки ингибирующей способности наноразмерных частиц оксида алюминия применительно к *Scenedesmus obliquus* может использоваться формула

$$I = \frac{N_C - N_T}{N_C} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где I – ингибирующая способность, %; N_C – среднее количество клеток водоросли в контрольной группе, ед/мл; N_T – среднее количество клеток водоросли после воздействия суспензией наноразмерных частиц оксида алюминия, ед/мл.

Адсорбционную способность частиц оксида алюминия по отношению к другим экотоксикантам, присутствующим в водной среде, можно оценить в ходе эксперимента, в рамках которого в водную суспензию наноразмерных частиц Al_2O_3 с концентрацией 1 мг/л вводят предполагаемый загрязнитель в концентрации от 0,05 до 0,5 мг/л. Отбор проб следует проводить через 10, 20, 30, 40, 50, 60, 180 и 360 мин после введения суспензии загрязнителя, по отношению к которому оценивается адсорбционная способность. При каждом отборе суспензии центрифугируют 10 мин при 12 000 об/мин. Концентрацию загрязнителя определяют в надосадочной жидкости методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Процент адсорбции загрязнителя можно установить по формуле

$$A = \frac{C_0 - C_e}{C_e} \cdot 100 \%,$$

где A – величина адсорбции загрязнителя наноразмерными частицами оксида алюминия, %; C_0 – начальная концентрация загрязнителя, мг/л; C_e – концентрация загрязнителя в надосадочной жидкости после взаимодействия наноразмерных частиц с оксидом алюминия, ед/мл.

Таким образом, показаны наиболее доступные и эффективные методологические подходы к оценке экологической токсичности наночастиц оксида алюминия. Показано, что достоверная оценка экологической токсичности оксида алюминия достигается при комплексном подходе, подразумевающем установление ингибирующей способности частиц по отношению к тестовым водным организмам и адсорбционной способности по отношению к более опасным неорганическим соединениям, присутствующим в водоемах.

Список литературы

1. Игнатова А.М., Землянова М.А. Биологическая оценка воздействия микро- и наноразмерных частиц оксида алюминия на

организм лабораторных животных в условиях острой токсичности // Токсикологический вестник. – 2020. – № 3 (162). – С. 33–40.

2. Сравнительная оценка бионакопления алюминия и морфологических изменений в легких и головном мозге при однократной ингаляционной экспозиции нанодисперсным оксидом алюминия / Н.В. Зайцева, М.А. Землянова, М.С. Степанков, А.М. Игнатова // Российские нанотехнологии. – 2019. – Т. 14, № 1–2. – С. 63–68.

3. Землянова М.А., Степанков М.С., Игнатова А.М. Исследование и оценка токсичности нанодисперсного оксида алюминия при многократной ингаляционной экспозиции // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. – 2019. – № 4. – С. 482–487.

4. Li X., Zhou S., Fan W. Effect of nano- Al_2O_3 on the toxicity and oxidative stress of copper towards *scenedesmus obliquus* // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2016. – no.13 (6). – P. 575–582.

Сведения об авторах

Игнатова Анна Михайловна – доктор технических наук, научный сотрудник Пермского краевого центра охраны труда, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: iampstu@gmail.com.

Землянова Марина Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией, Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения.

А.М. Игнатова, Г.З. Файнбург, М.Н. Игнатов

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО БАКТЕРИЦИДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ УПАКОВКИ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ СТЕРИЛЬНОСТИ ЭНДОПРОТЕЗОВ

Рассматривается вопрос снижения риска инфицирования эндопротезных изделий внутрибольничными штаммами устойчивых микроорганизмов за счет использования источников ультрафиолетового излучения на основе сварочной дуги и вакуумной упаковки при промышленной подготовке изделий.

Ключевые слова: эндопротезирование, стерилизация, ультрафиолет, внутрибольничные инфекции.

A.M. Ignatova, G.Z. Fainburg, M.N. Ignatov

USE OF UV BACTERICIDAL RADIATION AND SPECIALIZED PACKAGING TO PROVIDE STERILE ENDOPROTHESIS

The paper deals with the issue of reducing the risk of infection of endoprosthesis devices with nosocomial strains of resistant microorganisms through the use of ultraviolet radiation sources based on a welding arc and vacuum packaging in the industrial preparation of products.

Keywords: endoprosthesis, sterilization, ultraviolet light, nosocomial infections.

В медицинской практике используется сразу несколько способов обеспечения стерильной чистоты поверхности хирургических инструментов и изделий, используемых при протезировании [1]. Применение нескольких методов в определенном порядке, разумеется, позволяет добиться желаемого результата – избавления от микроорганизмов и их споровых форм, но при этом отмечается [2], что в совокупности методы стерилизации неизбежно изменяют свойства поверхности медицинских изделий и инструментов. Даже микронные изменения параметров поверхности эндопротезных изделий влияют на их дальнейшую функциональность. Несмотря на то, что стерилизации протезных изделий уделяется значительное внимание, по данным исследования [3], при первичном эндопротезировании тазобедренных суставов до

30 % осложнений обусловлены инфицированием в процессе операции штаммами микроорганизмов, относящихся к внутрибольничным. Вышеперечисленное указывает на то, что постоянный контроль эффективности способов стерилизации и поиск новых решений в этой области является актуальной проблемой. Обеспечение стерильности поверхности эндопротезных изделий является актуальной проблемой протезирования не только на этапах практического применения материалов, одобренных для человека, но и на этапах экспериментальных исследований по оценке перспективности использования инновационных материалов для изготовления эндопротезов, поскольку инфицирование может повлиять на достоверность оценки применимости того или иного материала.

Наиболее эффективными средствами стерилизации в борьбе с внутрибольничными инфекциями являются физические методы воздействия, в частности воздействие ультрафиолетовым бактерицидным облучением, источниками которого являются бактерицидные лампы, специализированные установки, а также сварочная дуга, данное воздействие относится к обязательным санитарно-противоэпидемическим (профилактическим) мероприятиям. Известно [4], что бактерицидным действием обладает ультрафиолетовое излучение с диапазоном длин волн 205–315 нм. Однако грибки и простейшие микроорганизмы менее чувствительны к указанному диапазону излучения. Кроме того, споровые формы микроорганизмов могут выжить при воздействии ультрафиолетового излучения. Именно по причине того, что ультрафиолетовое излучение рекомендуемого диапазона не одинаково эффективно к различным типам патогенов, на практике невозможно ограничиваться только этим средством стерилизации.

Разумеется, при определенном диапазоне ультрафиолетового излучения, как правило в области короткого ультрафиолета, эффективность его воздействия на все микроорганизмы значительно выше. С минимальными затратами воздействие ультрафиолетового излучения в коротковолновой области может оказываться с помощью излучения, генерируемого сварочной дугой. Применение таких эффективных как с технической, так и с экономической точки зрения устройств в лечебных учреждениях осложняется необходимостью в персонале с навыками работы с соответствующим оборудованием. Однако воздействие на эндопротезные изделия ультрафиолетовым излучением широкого спектра может проводиться непосредственно по месту их изготовления. Кроме того, эффективной

профилактикой инфицирования внутрибольничными штаммами микроорганизмов при проведении операций по эндопротезированию, по мнению авторов, также является минимизация контакта эндопротеза со средой лечебного учреждения, а поскольку эффект стерилизации является непродолжительным, необходимо использование упаковок для изделий, прошедших данный вид обработки.

Авторами предлагается технологическое решение для промышленной обработки и упаковки эндопротезных изделий для замены тазобедренного сустава непосредственно при производстве с целью повышения эффективности защиты изделий от осеменения штаммами внутрибольничных патогенных микроорганизмов.

Технология включает следующие этапы:

- механическая очистка эндопротезных изделий от технологических загрязнений;

- воздействие на изделия температурой 150 °С (регулируемый параметр; так, для некоторых эндопротезных изделий может быть установлена более низкая температура);

- воздействие на изделие дуговым источником ультрафиолетового излучения полным спектром в течение 15 мин;

- воздействие на изделие дуговым источником ультрафиолетового излучения в диапазоне 200–300 нм в течение 25 мин.;

- воздействие на изделие дуговым источником ультрафиолетового излучения в диапазоне 100–200 нм в течение 25 мин;

- упаковка изделия в вакуумный блистер непосредственно по месту стерилизации.

Технология позволит обеспечить сокращение риска инфекционных осложнений в практике эндопротезирования, при условии, что она будет реализована на изделиях, доработка конструкции которых при операции будет незначительной. Это требует индивидуализации формы изделий и использования трехмерного моделирования по данным рентгенологического и томографического обследования пациента.

Поставка изделия должна проводиться вместе со всей оснасткой, которая также должна обрабатываться по представленной технологии. В особенности это относится к винтам крепления.

Кроме того, эффективность использования предлагаемой технологии может быть улучшена за счет введения в упаковочный материал средств контроля сохранения вакуума и целостности упаковки.

Таким образом, предложена технология использования ультрафиолетового бактерицидного излучения и специализированной упаковки для обеспечения стерильности эндопротезов и снижения риска инфицирования штаммами внутрибольничных микроорганизмов.

Список литературы

1. Балабанова И.Т. Новые технологии в операционном блоке // Медицинская сестра. – 2014. – № 1. – С. 3–5.
2. Прохоренко В.М., Азизов М.Ж., Шакиров Х.Х. Сопутствующие заболевания у пациентов с ревизионным эндопротезированием тазобедренного сустава // Acta Biomedica Scientifica. – 2017. – № 5–1 (117). – С. 136–140.
3. Внутрибольничные инфекции: новые горизонты профилактики / В.И. Покровский, В.Г. Акимкин, Н.И. Брико, Е.Б. Брусина, Л.П. Зуева, О.В. Ковалишенина, В.Л. Стасенко, А.В. Тутелян, И.Ф. Фельдблюм, В.В. Шкарин //Здравоохранение. – 2011. – № 1. – С. 14–20.
4. Онищенко Г.Г. О состоянии заболеваемости внутрибольничными инфекционными болезнями //Стерилизация и внутрибольничные инфекции. – 2006. – № 1. – С. 5–7.

Сведения об авторах

Игнатова Анна Михайловна – доктор технических наук, ведущий научный сотрудник Пермского краевого центра охраны труда, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: iampstu@gmail.com.

Файнбург Григорий Захарович – доктор технических наук, профессор, директор Пермского краевого центра охраны труда, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: faynburg@yandex.ru.

Игнатов Михаил Николаевич – доктор технических наук, профессор кафедры «Сварочное производство, метрология и технология материалов», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: imnpstu@gmail.com.

А.В. Ионов, И.А. Пермякова

**ВЛИЯНИЕ СОСТАВА И КИСЛОТНОСТИ СРЕДЫ
НА СКОРОСТЬ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ, СПОСОБНЫХ
К БИОТРАНСФОРМАЦИИ ГЛИЦЕРИНСОДЕРЖАЩИХ
ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА ЭФИРОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ**

Рассмотрена проблема переработки глицерина, образующегося при производстве эфиров жирных кислот. Подобрана культура микроорганизмов, способная расти на глицеринсодержащих отходах. Проанализирован спектр особенностей глицеринсодержащих отходов, образующихся в ходе технологического процесса получения эфиров жирных кислот. Выяснено влияние этих особенностей на скорость роста культуры.

Ключевые слова: эфиры жирных кислот, глицерин, биодизель, спирты, экология, биотрансформация.

A.V. Ionov, I.A. Permyakova

**INFLUENCE OF THE COMPOSITION AND ACIDITY
OF THE MEDIUM ON THE GROWTH RATE OF MICROORGANISMS
CAPABLE FOR BIOTRANSFORMATION OF GLYCEROL-CONTAINING
WASTES FROM THE PRODUCTION OF FATTY ACID ESTERS**

The problem of processing glycerin formed during production and fatty acid esters is considered. A culture of microorganisms capable for growing on glycerin-containing waste was selected. The spectrum of conditions that can be formed during the technological process of obtaining fatty acid esters is analyzed. The influence of these factors on the growth rate of the culture has been studied.

Keywords: esters of fatty acids, glycerin, biodiesel, alcohols, ecology, biotransformation.

Классическим процессом производства биодизеля является перэтерификация растительных жиров спиртами, обычно этанолом или метанолом, с использованием различных катализаторов. Процесс производства биодизеля из растительных масел имеет побочный продукт процесса – глицерин. С распространением биодизеля на рынке начал формироваться избыток глицерина, поэтому актуальной задачей является переработка глицерина в другие коммерческие продукты, что

делает технологию производства биодизеля малоотходной. Кроме того, создание малоотходных технологий является одним из основных показателей рентабельности процесса [1]. Глицерин в настоящее время наиболее часто используется в пищевой и фармацевтической промышленности. Однако это касается только чистого глицерина. Глицериновая фаза, образующаяся при производстве биодизеля, содержит низкие концентрации глицерина, что затрудняет выделение и очистку глицериновой фазы. В связи с этим становятся перспективными способы использования глицериновой фазы в качестве субстрата для культивирования микроорганизмов, способных биотрансформировать глицерин в полезные продукты.

Биотрансформация глицерина позволяет получить значительное количество полезных продуктов, таких как 1,3-пропандиол, дигидроксиацетон, этанол, сукцинат, пропионовая кислота, лимонная кислота [2–4].

В зависимости от технологии производства и типа используемого катализатора отход производства может быть осложнен наличием различных солей. Также отход может иметь различные значения pH в зависимости от количества нейтрализующего агента и характера технологического процесса.

Для моделирования процесса биотрансформации глицеринсодержащего отхода производства эфиров жирных кислот использовалась культура молочной плесени, оптимизированная для роста на средах, имеющих в качестве единственного источника углерода глицерин. В качестве модульной среды использовалась модифицированная среда Гудвина [5].

В целях установления влияния на рост культуры различных солей, которые могут использоваться в технологическом процессе получения эфиров, и как следствие, могут оказаться в глицеринсодержащем отходе, была проведена серия опытов по культивированию микроорганизмов в присутствии неорганических солей. Для проведения опыта были выбраны следующие соли: Na_2SO_4 , K_2SO_4 , Na_3PO_4 . В качестве образца сравнения выбрана стандартная среда культивирования, содержащая KH_2PO_4 . Интенсивность роста культуры оценивалась посредством фотоэлектроколориметрии.

Результаты проведения опыта (табл. 1, 2) позволяют сделать вывод, что присутствие сторонних солей снижает удельную скорость роста на 17–32 %. Наибольшее негативное влияние оказывает присутствие сульфата калия (K_2SO_4). Исходя из полученных дан-

ных, можно утверждать, что наиболее оптимальными реагентами для проведения переэтерификации является гидроксид калия или гидроксид натрия в качестве катализатора и ортофосфорной кислоты в качестве средства нейтрализации щелочи.

Таблица 1

Оптическая плотность культуральной жидкости при периодическом культивировании D в присутствии различных солей и времени культивирования, t , ч, при 30 °С и скорости перемешивания 150 об/мин

t , ч	Наименование соли			
	KH_2PO_4	K_2SO_4	Na_2SO_4	Na_3PO_4
0	0,009	0,021	0,015	0,02
24	0,503	0,315	0,425	0,49
48	0,611	0,79	0,934	0,583
96	1,215	1,24	1,004	0,963
144	1,342	1,314	1,179	1,299

Таблица 2

Удельная скорость роста культуры, μ , ч⁻¹, в присутствии различных солей, при 30 °С и скорости перемешивания 150 об/мин

Наименование соли	KH_2PO_4	K_2SO_4	Na_2SO_4	Na_3PO_4
μ , ч ⁻¹	0,168	0,113	0,139	0,133

Для выяснения влияния кислотности среды на скорость роста микроорганизмов, использующихся для биотрансформации глицерина, была выбрана среда Гудвина с глицерином в качестве единственного источника углерода. Данная среда доводилась до необходимых значений pH водным раствором аммиака. Исходный pH среды равен 5.

Для постановки эксперимента были выбраны значения pH 5, 6, 7, 8, 9 (табл. 3).

Колебания pH могут в достаточной мере влиять на скорость роста культуры. Ингибирование наблюдается при щелочном pH. В слабокислой среде наблюдается прирост скорости роста. Результаты этого опыта могут свидетельствовать о том, что при нейтрализации среды глицеринсодержащих отходов после процесса переэтерификации среду стоит доводить до слабокислой реакции, pH~ 5.

Таблица 3

Удельная скорость роста культуры μ , ч^{-1} ,
при различном pH среды, при 28 °С и скорости
перемешивания 130 об/мин

pH	5	6	7	8	9
μ , ч^{-1}	0,089	0,081	0,060	0,058	0,023

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что оптимальным условием для проведения биотрансформации глицеринсодержащего отхода будет являться слабокислая pH, а наименьшее негативное влияние на скорость роста оказывают гидрофосфаты калия, поэтому в качестве катализатора и его нейтрализатора в процессе получения эфиров жирных кислот оптимально использовать гидроксид калия и ортофосфорную кислоту соответственно.

Список литературы

1. Дебабов В.Г. Биотопливо // Биотехнология. – 2008. – № 1. – С. 3–14.
2. Зотов Ю.Л., Заправдина Д.М., Зотова Н.Ю. Многофункциональные добавки на основе глицерина для переработки поливинилхлорида в пластикаты // Известия волгоград. гос. техн. ун-та. – 2017. – № 4. – С. 86–89.
3. Biebl H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* – batch and continuous culture studies // J. Ind. Microbiol. Biotech. – 2001. – Vol. 27. – P. 18–26.4.
4. Németh A, Kupcsulik B., Sevelle B. 1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026 // World. J. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – Т. 19. – P. 659–663.
5. Лунин В.В., Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Мысякина И.С., Ивашечкин А.А., Богдан В.И., Фефилова Е.П. // Прикладная биохимия и микробиология – 2013 – Т. 49, № 1. – С. 53–60.
6. Воронина Н.С., Пермякова И.А., Вольхин В.В. Переработка глицерина, полученного в результате производства биодизеля, с использованием дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae* // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. химическая технология и биотехнология. – 2017. – № 4. – С. 67–78.

Об авторах

Ионов Андрей Владимирович – магистрант кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: AsterosLoL@ gmail.com.

Пермякова Ирина Александровна – кандидат технических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнологии», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: permyakova-i88@yandex.ru.

Я.А. Климова, М.В. Степанова, Л.Д. Аснин

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ УДЕРЖИВАНИЕ
ПЕНТАПЕПТИДОВ НА ХИРАЛЬНЫХ НЕПОДВИЖНЫХ
ФАЗАХ С ПРИВИТЫМ АНТИБИОТИКОМ РИСТОЦЕТИНОМ А**

Исследованы закономерности удерживания пентапептидов на хиральных неподвижных фазах *Nautilus E* и *Chirobiotic R* с привитым макроциклическим антибиотиком ристоцетином А в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии. Рассмотрено влияние состава и pH подвижной фазы на разделение пентапептидов.

Ключевые слова: хроматография, хиральная неподвижная фаза, ристоцетин, адсорбция.

Y.A. Klimova, M.V. Stepanova, L.D. Asnin

**CHROMATOGRAPHIC RETENTION OF PENTAPEPTIDES
ON CHIRAL STATIONARY PHASES WITH GRAFTED
ANTIBIOTIC RISTOCETIN A**

The regularities of the retention of pentapeptides on chiral stationary phases *Nautilus-E* and *Chirobiotic R* with grafted macrocyclic antibiotic ristocetin A under conditions of high performance liquid chromatography were studied. The influence of the composition and pH of the mobile phase on the separation of pentapeptides is considered.

Keywords: chromatography, chiral stationary phase, ristocetin, adsorption.

Низкомолекулярные пептиды широко применяются в качестве фармацевтических препаратов [1]. Лекарственная субстанция в таких средствах должна обладать высокой степенью чистоты, включая энантиомерную чистоту, т.е. отсутствие стереоизомеров пептида, не проявляющих требуемую лекарственную активность. Популярным методом контроля энантиомерного состава пептидных препаратов является хиральная хроматография – хроматографический метод, в котором разделение энантиомеров достигается за счет образования адсорбционных комплексов разной прочности между хиральной неподвижной фазой (ХНФ) и энантиомерами [2, 3]. Хорошие результаты в энантиоразделении коротких пептидов показали ХНФ с привитыми макроциклическими антибиотиками [4].

Целью представленной работы является изучение возможности хроматографического разделения пентапептидов группы энкефалинов на ХНФ с одним из таких антибиотиков – ристоцетином А.

Измерения проводились на двух хроматографах: Shimadzu LC-20 ADXR и Ultimate 3000 (Thermo Scientific) с УФ-детекторами. Исследовали колонки *Nautilus-R* («Биохиммак СТ», Россия) и *Chirobiotic R* (Supelco, США) с привитым указанным антибиотиком (таблица). Размеры обеих колонок – 250×4,6 мм, диаметр частиц сорбента – 5 мкм. Экспериментальные данные получали при температуре 25 °С и расходе подвижной фазы 1 мл/мин. В работе использовали пентапептиды фирмы Sigma Aldrich (Германия): Тир-Гли-Гли-Фен-Л-Лей (**I**), Тир-Д-Ала-Гли-Фен-Д-Лей (**II**), Тир-Д-Ала-Гли-Фен-Л-Лей (**III**), Тир-Гли-Гли-Фен-Мет (**IV**). Объем проб составлял 2 мкл с концентрацией 1 мг/мл. В качестве подвижных фаз (ПФ) использовали смеси вода–метанол (0–20 об.% MeOH), модифицированные либо ацетатом аммония (0,0002 М), либо ацетатным буфером (0,1 М) с переменной величиной pH.

Таблица 1

Влияние состава подвижной фазы на фактор удерживания пентапептидов. Концентрация ацетата аммония – $2 \cdot 10^{-4}$ М, $T = 25^\circ\text{C}$

Вещество	<i>Nautilus-R</i>			<i>Chirobiotic R</i>		
	H ₂ O	MeOH:H ₂ O (10:90)	MeOH:H ₂ O (20:80)	H ₂ O	MeOH:H ₂ O (10:90)	MeOH:H ₂ O (20:80)
	<i>k</i>					
I	9,379	5,877	4,481	6,481	2,327	1,462
II	7,625	4,304	3,136	7,582	2,598	1,546
III	13,279	8,696	6,944	7,755	2,634	1,654
IV	12,129	8,625	6,881	5,781	2,862	1,866

Зависимость удерживания пентапептидов от содержания органического компонента в подвижной фазе (таблица) соответствует закономерностям для обращенно-фазной хроматографии: фактор удерживания уменьшается с увеличением доли органического компонента в элюенте. Удерживание оптически активных веществ обусловлено наличием энантиоселективных и неселективных взаимодействий. Несмотря на то, что хиральный селектор на обоих колонках одинаков, порядок выхода пентапептидов разный. Извест-

но, что методика иммобилизации антибиотика на поверхности исследуемых ХНФ разная. В случае *Chirobiotic R* ристоцетин А пришивают к силикагелю через присоединенную к антибиотику изотионатную группу, а в случае *Nautilus-R* используют реакцию антибиотика с эпоксирированным силикагелем. Это обуславливает некоторые различия в структуре хиральных селекторов, что, возможно, объясняет наблюдаемые результаты.

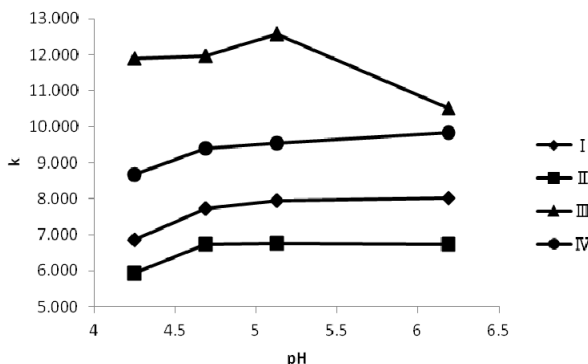


Рис. 1. Зависимость факторов удерживания пентапептидов от pH элюента на колонке *Nautilus-R*. ПФ: 0,1 М водный ацетатный буфер

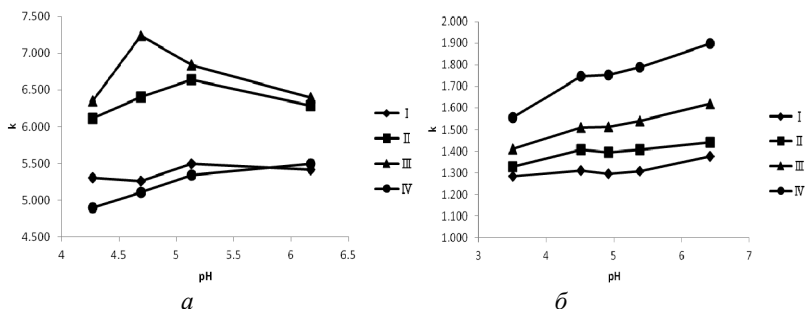


Рис. 2. Зависимость факторов удерживания пентапептидов от pH элюента на хиральной неподвижной фазе *Chirobiotic R*. Состав элюента: а – 100 % H₂O; б – MeOH:H₂O (20:80)

На рис. 1 представлены зависимости факторов удерживания (k') пентапептидов от pH на колонке *Nautilus-R*. Для данной колонки наличие или отсутствие буфера в элюенте не оказывает существен-

ного влияния на хроматографическое поведение пентапептидов в диапазоне исследуемых значений pH. Порядок выхода пентапептидов из колонки *Nautilus-R*: $\text{II} < \text{I} < \text{IV} < \text{III}$. Для колонки *Chirobiotic R* характерно изменение порядка выхода аналитов при появлении в составе ПФ органического компонента. Порядок выхода аналитов следующий: $\text{IV} < \text{I} < \text{II} < \text{III}$ для водной ПФ и $\text{I} < \text{II} < \text{III} < \text{IV}$ для водно-метанольной ПФ (рис. 2). Полученные данные показывают, что наличие *D*-аминокислоты у *C*-терминального конца приводит к более прочному удерживанию пентапептидов на изученных ХНФ. Характер зависимости факторов удерживания от pH на обеих колонках примерно одинаковый. В ПФ, не содержащих органический растворитель, *k* растет с повышением pH в диапазоне от 4,3 до 4,7 для колонки *Nautilus-R* и в диапазоне 4,3 до 5,1 для *Chirobiotic R*, а далее стабилизируется при более высоких pH. Однако это не относится к пентапептиду **III** с *C*-терминальным *D*-лейцильным остатком. В этом случае на обеих колонках зависимость *k* от pH проходит через максимум. Для всех пентапептидов зависимость *k* от pH в MeOH:H₂O (20:80) буфере монотонно возрастает с увеличением pH.

Список литературы

1. Su T.-P. Delta opioid peptide [D- Ala²,D-Leu⁵]-enkephalin promotes cell survival // J. Biomed. Sci. – 2000. – Vol. 7, № 3. – P. 195–199.
2. Lämmerhofer M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases // J. Chromatogr. A. – 2010. – Vol. 1217, no. 6. – P. 814–856.
3. Chiral stationary phases for liquid chromatography: Recent developments / Teixeira J. [et al.] // Molecules. – 2019. – Vol. 24, no. 5.
4. Ilisz I., Berkecz R., Péter A. HPLC separation of amino acid enantiomers and small peptides on macrocyclic antibiotic-based chiral stationary phases: a review // J. Sep. Sci. – 2006. – Vol. 29, no. 10. – P. 1305–1321.

Об авторах

Климова Яна Анатольевна – аспирант кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: yana-klimova-1995@mail.ru.

Степанова Мария Владимировна – аспирант кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: zattika@mail.ru.

Аснин Леонид Давыдович (Пермь, Россия) – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: asninld@pstu.ru.

**М.А. Клочкова, Д.И. Зиганшина,
А.В. Кудинов, Л.Д. Аснин**

РАСТВОРИМОСТЬ ЛЕЙЦИЛЛЕЙЦИНА В СМЕСЯХ ВОДА–МЕТАНОЛ

Определена растворимость L-лейцил-L-лейцина в водно-метанольных смесях с различным содержанием метанола (0–100 об. %) методом насыщения при температуре 25 °С. Установлено, что растворимость является немонотонной функцией состава смеси. Минимальная растворимость наблюдается в чистом метаноле, а максимальная – в чистой воде, при этом еще один локальный максимум наблюдается при 60 об. % метанола.

Ключевые слова: растворимость, бинарные растворители, дипептиды, лейциллейцин.

**M.A. Klochkova, D.I. Ziganshina,
A.V. Kudinov, L.D. Asnin**

LEUCYL-LEUCINE SOLUBILITY IN WATER-METHANOL MIXTURES

The solubility of L-leucyl-L-leucine in water-methanol mixtures with different methanol content (0-100 vol. %) was measured by the saturation method at a temperature of 25 °C. It was found that the solubility is a non-monotonous function of the mixture content. The minimal solubility is found in pure methanol, and the maximal solubility in pure water, with one more local maximum observed at 60 vol. % methanol.

Keywords: solubility, binary solvents, dipeptides, leucyl-leucine.

В настоящее время дипептиды производятся в промышленных масштабах для использования их в пищевой и фармацевтической промышленности [1]. Препараты дипептидов высокой чистоты также требуются в качестве стандартов в физиологических исследованиях и клиническом анализе [2, 3]. Одним из важных физических свойств дипептидов, знание которого необходимо как для разработки технологических процессов, так и для работы в лаборатории, является растворимость (S) в различных растворителях. Помимо практической значимости величина S является косвенной характеристикой липофильности веществ. В представленной рабо-

те измеряется растворимость одного из стереоизомеров лейциллейцина, L-Leu-L-Leu, в растворителях состава вода – метанол. Ранее мы проводили приближенную оценку растворимости этого дипептида путем последовательного добавления растворителя до полного растворения анализируемого вещества при комнатной температуре [4]. Полученные таким образом значения характеризовались значительной погрешностью, в том числе по причине флуктуаций температуры в лаборатории, и требовали уточнения. Других сведений о растворимости Leu-Leu в водно-органических смесях в доступной нам литературе не обнаружено.

В экспериментах использовали L-Leu-L-Leu фирмы Bachem (Швейцария), высушенный под вакуумом (1 мм рт. ст.) в течение 5 ч. Такая подготовка была необходима, поскольку реактив содержал 1,3 % гигроскопической влаги. Измерения выполнялись методом насыщения для смесей с содержанием метанола 0, 30, 60, 80, 90 и 100 %. Навеску образца, около 30 мг, помещали в 10-миллиметровую виалу и добавляли 1,5 мл растворителя. Виалу герметично закрывали, интенсивно встряхивали на вортексе 1 мин и выдерживали в термостате при $(25,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ в течение 24 ч при периодическом встряхивании. По окончании термостатирования виалы доставали и быстро отбирали жидкую фазу через шприцевой фильтр с размером пор 0,45 мкм. Пробу насыщенного раствора разбавляли в 10 раз водой и определяли содержание дипептида на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Германия) с хроматографической колонкой Cyclobond I-2000 ($250 \times 4,6$ мм) компании Supelco (США). Подвижной фазой служила смесь вода – метанол (40:60). Хроматограммы записывали с помощью УФ-детектора на длине волны 220 нм. Объем пробы был 5 мкл. Для каждого состава растворителя эксперимент выполняли два раза. Приведенные ниже результаты являются средними арифметическими из этих двух параллельных определений.

Полученные данные сравниваются на рисунке с оценками растворимости лейциллейцина, найденными в работе [4] приближенным методом с использованием образцов дипептида без предварительной осушки в вакууме. Как видно, кривые зависимости S от концентрации метанола качественно подобны, но абсолютные значения S отличаются иногда в 2 раза. Максимальная растворимость наблюдается в чистой воде, несмотря на наличие в молекуле двух гидрофобных изопропильных радикалов.

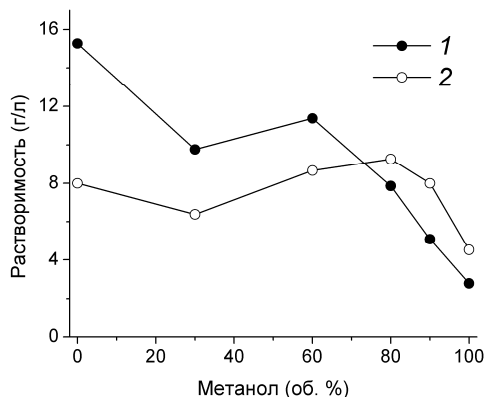


Рис. Зависимость растворимости L-Leu-L-Leu от состава растворителя, найденная в данной работе (1) и приближенным методом в работе [4] (2)

Чистый метанол характеризуется наименьшей растворяющей способностью по отношению к лейциллейцину. Видимо, это связано с существованием дипептида в цвиттер-ионной форме – менее полярный, чем вода, метанол хуже сольватирует ионизированные карбоксильную и аминную группы дипептида и благодаря более низкому значению диэлектрической проницаемости обуславливает более сильное электростатическое притяжение между заряженными частицами. Интересно, что на зависимости S от доли метанола наблюдается локальный максимум в 60 % CH_3OH . Очевидно, что при концентрации метанола 40–60 об. % имеет место некоторое увеличение сольватирующей способности бинарного растворителя за счет взаимодействия метанола с гидрофобными участками молекулы дипептида. При дальнейшем увеличении его концентрации противоположно действующие эффекты от уменьшения диэлектрической проницаемости и нехватки воды для эффективной сольватации заряженных групп существенно перевешивают влияние этого взаимодействия, что ведет к резкому уменьшению растворимости с увеличением содержания спирта.

Список литературы

1. Yagasaki M., Hashimoto Sh. Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 81. – P. 13–22.

2. Bai L., Sheeley S., Sweedler J.V. Analysis of endogeneous D-amino acid-containing peptides in Metazoa // *Bioanal. Rev.* – 2009. – Vol. 1. – P. 7–24.

3. Free amino acid and dipeptide changes in the body fluids from Alzheimer's disease subjects / A.N. Fonteh, R.J. Harrington, A. Tsai, P. Liao, M.G. Harrington // *Amino Acids.* – 2007. – Vol. 32. – P. 213–224.

4. Enantioselective retention mechanisms of dipeptides on antibiotic-based chiral stationary phases. II. Effect of the methanol content in the mobile phase / L.D. Asnin, M.V. Kopchenova, S.E. Vozisov, M.A. Klochkova, Y.A. Klimova // *J. Chromatogr. A.* – 2020. – Vol. 1626. Art. 461371.

Об авторах

Клочкова Мария Александровна – студентка, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: mary99844@gmail.com.

Зиганшина Дарья Игоревна – студентка, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: dahsha2012@ya.ru.

Кудинов Андрей Викторович – старший преподаватель кафедры «Химические технологии», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: kudinov@pstu.ru.

Аснин Леонид Давыдович – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: asninld@mail.ru.

Н.Е. Ковина, Е.А. Фарберова, Е.А. Тиньяева, А.С. Максимов

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ БИОХИМИЧЕСКОГО КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ЛАНТАНА НА УГЛЕРОДНЫХ СОРБЕНТАХ

Редкоземельные металлы находят широкое применение в различных областях деятельности человека, но на данный момент методы добычи и переработки РЗЭ не являются экологически безопасными. Известно, что РЗЭ обладают способностью к комплексообразованию с органическими лигандами. В работе представлены результаты исследования влияния лантана на микроорганизмы рода *Bacillus*, а также исследование сорбции металла на углеродных сорбентах. Исследовано распределение лантана между биомассой и культуральной жидкостью.

Ключевые слова: лантан, редкоземельные элементы (РЗЭ), редкоземельные металлы (РЗМ), биоконцентрирование, микроорганизмы.

N.E. Kovina, E.A. Farberova, E.A. Tingaeva, A.S. Maksimov

INVESTIGATION OF THE POSSIBILITY OF BIOCHEMICAL CONCENTRATION OF LANTHANUM ON CARBON SORBENTS

Rare earth metals are widely used in various fields of human activity, but at the moment the methods of extraction and processing of REE are not environmentally safe. It is known that REES have the ability to complex with organic ligands. The paper presents the results of the study of the effect of lanthanum on microorganisms *Bacillus spp.*, as well as the sorption of metal on carbon sorbents. The distribution of lanthanum between the biomass and the culture liquid was studied.

Keywords: lanthanum, rare earth elements (REE), rare earth metals (REM), bioconcentration, microorganisms.

Лантан встречается в природе в виде соединений (фосфата, фторокарбоната, силиката и т.д.) в некоторых минералах, которые, кроме РЗМ, содержат кальций, цирконий, гафний, торий, уран, барий, железо и др. [3] На сегодняшний день существует большое количество различных методов извлечения и концентрирования РЗЭ. [2] Но главным недостатком этих методов является их экологическая опасность для окружающей среды. Известно, что РЗЭ обладают способностью к комплексообразованию с органическими лигандами. В процессе жизнедеятельности микроорганизмов выделяется большое количество метаболитов, которые могут являться

лигандами при комплексообразовании. Таким образом, появляется возможность выделения РЗЭ с помощью микроорганизмов.

Цель работы – подбор оптимальных условий концентрирования лантана из водных растворов. Объект исследования – микроорганизмы рода *Bacillus*, выделенные из почвы по методу Коха. Культивирование проводили на питательной среде LB Medium [1]. Лантан вносили в питательную среду в виде соли – хлорида лантана (III) (LaCl_3). В качестве сорбентов использовали активные угли: АГ-5, АГ-3, БАУ-А, КАУ-А, а также активную угольную ткань. [4]

Первый этап работы – исследование влияния лантана на микроорганизмы рода *Bacillus*. Проводили культивирование на среде LB Medium с добавлением лантана. Концентрация элемента в питательной среде – 5, 10, 20 мг/дм³. Определены характеристики роста микроорганизмов рода *Bacillus* без добавления элемента и с добавлением лантана в концентрации 10 мг/л. Результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристики роста микроорганизмов

Характеристика	$[\text{La}^{3+}] = 0 \text{ мг/дм}^3$	$[\text{La}^{3+}] = 10 \text{ мг/дм}^3$
Лаг-фаза, ч	3	3
Экспоненциальная фаза	18	18
Стационарная фаза	47,5	47,5
Удельная скорость роста, ч ⁻¹	0,0298	0,0205
Время генерации	6	6

В ходе работы обнаружено, что содержание в питательной среде катиона металла в концентрациях от 5 до 20 мг/дм³ не влияет на рост культуры.

Второй шаг работы – исследование распределения лантана между биомассой и культуральной жидкостью при культивировании микроорганизмов рода *Bacillus*. При культивировании вводили в питательную среду 20 мг/дм³ катиона металла. Определяли значение абсолютного содержания лантана в культуральной жидкости и биомассе. В ходе исследования определили, что металл распределяется в соотношении 1:20 между биомассой и культуральной жидкостью соответственно.

Третий этап работы – выбор сорбента. Образец активных углей погружали в раствор соли лантана в соотношении 1:5. Концен-

трация катиона металла составляла 10 мг/дм³. Выдерживали образец углей в растворе в течение 20, 40 и 60 мин. Отделяли раствор и определяли концентрацию лантана в фильтрате. По результатам эксперимента определяли сорбционную емкость (Е) сорбентов и степень извлечения катиона металла из раствора. Данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Исследование сорбционных свойств
активных углей по лантану

Время контакта, мин	Е, мг/г				Степень извлечения, %			
	АГ-5	АГ-3	БАУ-А	КАУ-А	АГ-5	АГ-3	БАУ-А	КАУ-А
20	0,04902	0,05	0,04994	0,0499	98,03	100	99,87	99,79
40	0,04994	0,05	0,04995	0,04996	99,87	100	99,89	99,93
60	0,04986	0,05	0,0499	0,04996	99,72	100	99,79	99,92

Навески ткани помещали в раствор соли лантана. Концентрация катиона металла составляла 12 мг/дм³. Выдерживали в течение 20, 40 и 60 мин. Отделяли раствор и определяли концентрацию лантана в фильтрате. По результатам эксперимента определяли степень извлечения катиона металла из раствора. Данные представлены в табл. 3.

Таблица 3

Исследование сорбционных свойств
активной угольной ткани по лантану

Время контакта, мин	m поглощенного La, мг			Степень извлечения, %		
	0,2 г	0,4 г	0,7 г	0,2 г	0,4 г	0,7 г
20	0,5719	0,4099	0,3868	91,6583	65,694	61,9865
40	0,59002	0,4696	0,4434	94,5545	75,2601	72,0577
60	0,57905	0,50065	0,484	92,7967	80,2317	77,5652

По результатам исследования определили, что наиболее эффективным сорбентом является активный уголь АГ-3, поскольку он поглощает весь лантан, содержащийся в растворе.

Помимо этого, проводится исследование биоконцентрирования La данным видом микроорганизмов с поверхности активных углей и тканей при внесении образцов углей в культуральную жидкость.

Список литературы

1. Atlas R.M. Handbook of microbiological media. – New York: Taylor & Francis Group, 2010. – 2037 p.
2. Пономарева М.А. Термодинамические характеристики сорбции анионных комплексов редкоземельных элементов: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.04. – СПб., 2014. – 136 с.
3. Рипан Р., Четяну И. Неорганическая химия. – М.: МИР, 1972. – Т. 2. – 872 с.
4. Сорбционное концентрирование лантана на модифицированных малополярных сорбентах / А.А. Терещенкова, М.А. Статкус, Т.И. Тихомирова, Г.И. Цизин // Вестник Московского университета. – 2013. – Т. 54, № 4. – С. 7.

Об авторах

Ковина Нина Евгеньевна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: kovinanina2000@gmail.com.

Фарберова Елена Абрамовна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: elenafarb@gmail.com.

Тиньгаева Елена Александровна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: teengaeva@mail.ru.

Максимов Андрей Сергеевич – заведующий лабораторией НИОКР кафедры «Аналитическая химия и экспертиза», Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: htb03starosta@gmail.com.

Н.М. Крылов

ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИКАЛСВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Рассмотрены преимущества применения эритроцитов в тест-системах для оценки воздействия химических веществ на живые организмы, причины возникновения и последствия окислительного стресса, представлены данные по мембраностабилизирующей активности некоторых химических веществ.

Ключевые слова: эритроциты, окислительный гемолиз, мембраностабилизирующая активность, радикалсвязывающая активность.

N.M. Krylov

STUDY OF THE RADICAL-BINDING ACTIVITY OF ORGANIC SUBSTANCES

The advantages of using erythrocytes in test systems for assessing the effects of chemical compounds on living organisms and the causes and consequences of oxidative stress are considered. Experimental data on the assessment of membrane stabilizing activity of some chemical compounds are presented.

Keywords: erythrocytes, oxidative hemolysis, membrane stabilizing activity.

Эритроциты являются наиболее многочисленными форменными клетками крови. Их основной функцией является осуществление газообмена в организме: перенос кислорода из легких к тканям и углекислого газа от тканей к легким при помощи гемоглобина и карбоангидразы. Гемоглобин составляет около 98 % массы содержащихся в цитоплазме эритроцита белков и осуществляет перенос кислорода за счет способности кислорода обратимо координироваться с ионом железа Fe^{2+} , входящим в состав гема. В норме эритроцит имеет форму двояковогнутого диска с утолщенными краями. Такая форма обусловлена отрицательным осмотическим давлением внутри клетки за счет работы Na^{+} -помпы и обеспечивает большее отношение площади поверхности клетки к объему в сравнении со сферической формой, что ускоряет газообмен. Эритроциты млекопитающих не содержат многих органелл (ядро, аппараты синтеза белков и липидов). Мембрана эритроцитов представляет

собой двойной липидный слой с большим содержанием полиненасыщенных жирных кислот. Такая характеристика этих клеток в совокупности с легкой доступностью делает их удобной моделью для проведения исследований по оценке влияния различных химических веществ на живые организмы. Эритроциты используются в тест-системах по оценке токсичности тяжелых металлов, химических соединений, в том числе биологически активных веществ, лекарственных средств, пестицидов, животных ядов и т.д. [1–4].

Одним из путей повреждения клетки является разрушение мембраны в условиях окислительного стресса, что может являться фактором развития многих заболеваний (атеросклероз, болезнь Альцгеймера, сахарный диабет, инсульт, инфаркт и др.). Окислительный стресс возникает в результате накопления активных форм кислорода, которые действуют на липиды клеточной мембраны, нарушая ее нормальное функционирование [5].

Активные формы кислорода (АФК) образуются в клетках, использующих кислород в процессе дыхания, и подразумевают под собой промежуточные продукты метаболизма кислорода. К ним относятся: синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), супероксидный ($\dot{\text{O}}_2^-$), гидроксильный ($\dot{\text{OH}}$), гидропероксильный ($\text{H}\dot{\text{O}}_2$), пероксильный ($\text{R}\dot{\text{O}}_2$) и алкоксильный ($\text{R}\dot{\text{O}}$) радикалы, монооксид ($\text{N}\dot{\text{O}}$) и диоксид азота ($\text{N}\dot{\text{O}}_2$), пероксинитрит-ион (ONOO^-), гипохлорит (ClO^-), озон (O_3), пероксид водорода (H_2O_2), монооксид углерода (CO) и др. АФК подразделяются на первичные (те, которые образуются в клетках в ферментативных реакциях) и вторичные (те, которые образуются при взаимодействии АФК между собой или другими молекулами) [5].

Первичным свободным радикалом, как правило, является супероксидный анион-радикал. Его образование происходит в митохондриях в электрон-транспортной цепи в результате потери электронов на промежуточных стадиях и их попадания на кислород. Образование супероксидного анион-радикала сопровождается образованием пероксида водорода в результате реакции дисмутации под действием супероксиддисмутазы (СОД).

Образовавшиеся свободные радикалы вызывают перекисное окисление липидов (ПОЛ). ПОЛ является одним из основных процессов повреждения клеточных мембран. Взаимодействие свободных радикалов с липидами приводит к появлению липидных радикалов,

которые в присутствии кислорода образуют пероксидные радикалы. Пероксидные радикалы инициируют отрыв атома водорода в α -положении атома углерода по отношению к двойной связи у полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов.

Факторами, провоцирующими образование АФК, также являются: ионизирующая радиация, ультрафиолетовое излучение, табачный дым, нитрозоамины, пищевые консерванты, пестициды [5].

Решением проблемы окислительного стресса является применение веществ, обладающих радикалсвязывающей (или антиоксидантной) активностью, т.е. способных обезвреживать АФК. Для оценки антиоксидантной активности химических веществ применяются тест-системы с использованием эритроцитов. Вещества, способные связывать свободные радикалы, предотвращают разрушение мембраны эритроцитов. Окислительный гемолиз в тестовых системах индуцируется различными химическими веществами, образующими свободные радикалы. Часто в исследованиях используется 2,2'-азобис (2-амидинопропан) дигидрохлорид (AAPH).

Целью исследования была сравнительная оценка и оптимизация тестовых систем с использованием AAPH и перекиси водорода в качестве источников свободных радикалов. В проделанных экспериментах исследовалась мембраностабилизирующая активность веществ различной структуры и липофильности: флуоренон, дифениловый эфир, кетопрофен и ранитидин. Пробы, содержащие исследуемые вещества в нескольких концентрациях, в присутствии окислителя инкубируются в термостате при температуре 37 °С в течение нескольких часов, затем каждая проба разливается в две пробирки, содержащие фосфатно-солевой буфер pH = 7,4 (PBS) или дистиллированную воду, обеспечивающую осмотический гемолиз. После центрифугирования надосадочную жидкость полученных проб разливают в лунки планшета и измеряют их оптическую плотность на мультипланшетном ридере Tecan M100 PRO. Мембраностабилизирующую активность вычисляют по формуле

$$MA = 100 \times OD_{\text{и}} / OD_{\text{г}},$$

где $OD_{\text{и}}$ – оптическая плотность супернатанта исследуемой пробы с PBS при длине волны 540 нм, $OD_{\text{г}}$ – оптическая плотность супернатанта исследуемой пробы с дистиллированной водой при длине волны 540 нм.

Целью дальнейшей работы является подбор условий проведения экспериментов для модифицированной тест-системы, в которой в качестве окислителя используется перекись водорода вместо ААРН. Применение перекиси водорода обусловлено тем, что она присутствует в живых организмах и принимает непосредственное участие в развитии окислительного стресса.

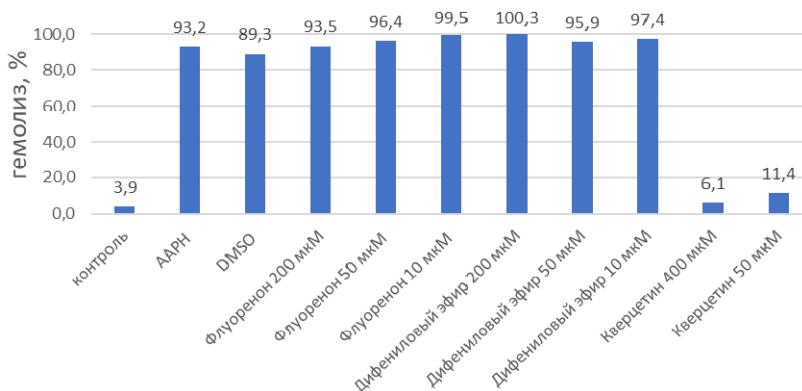


Рис. Изучение мембраностабилизирующей активности флуоренона и дифенилового эфира

Пример полученных результатов приведен на рисунке. На графике виден низкий уровень гемолиза в пробах без ААРН (контроль), в пробах с кверцетином (обладает сильной мембраностабилизирующей активностью) и высокий уровень гемолиза в контрольной пробе ААРН, что говорит о правильной работе системы.

Выводы

На основании полученных в результате экспериментов данных можно заключить, что вещества флуоренон и дифениловый эфир не проявляют мембраностабилизирующей активности, кетопрофен проявляет радикалсвязывающее действие, относительно ранитидина однозначный вывод сделать не удалось, необходимо выполнить дополнительный эксперимент.

Список литературы

1. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Эритропоэз и его регуляция. Общие характеристики эритроцитов, их свойств и функций // Успехи современного естествознания – 2015. – № 1-2. – С. 325–328.
2. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Особенности структуры и функций эритроцитарной мембраны // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 1-2. – С. 328–331.
3. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Метаболические особенности эритроцитов // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 1-2. – С. 331–332.
4. Шевченко О.Г., Шишкина Л.Н. Анализ метода окислительного гемолиза эритроцитов крови для оценки антиоксидантной и мембранопротекторной активности природных и синтетических соединений // Успехи современной биологии. – 2014. – Т. 134, № 2. – С. 133–148.
5. Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н. Окислительно-восстановительные процессы в клетках: моногр. / БГУ. – Минск, 2008. – 159 с.

Об авторах

Крылов Никита Максимович – студент бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: nikitakrilove99@gmail.com.

Научный руководитель – Красных Ольга Петровна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология» Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: ol.krasnykh@pstu.ru.

А.А. Лобанова, О.И. Бахирева

ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ОТ ФОРМАЛЬДЕГИДА

Представлены экспериментальные данные, идентифицирующие и характеризующие культуру микроорганизмов, которая была выделена из производственных сточных вод, содержащих в качестве основного загрязнителя формальдегид. Основной целью использования культуры является биологическая очистка от формальдегида. Рассмотрено влияние загрязняющего вещества – формальдегида – на рост и развитие микроорганизмов.

Ключевые слова: культура микроорганизмов, морфологические признаки, формальдегид, диско-диффузионный метод, кривая роста, биологическая очистка

A.A. Lobanova, O.I. Bakhireva

STUDY OF MICROBIAL CULTURES FOR BIOLOGICAL WASTEWATER TREATMENT FROM FORMALDEHYDE

This paper presents experimental data identifying and characterizing the culture of microorganisms that was isolated from industrial wastewater containing formaldehyde as the main pollutant. The main purpose of using the culture is the biological purification of formaldehyde. The influence of the formaldehyde contaminant on the growth and development of microorganisms is considered.

Keywords: culture of microorganisms, morphological features, formaldehyde, disco-diffusion method, growth curve, biological purification.

В настоящее время стоит глобальная проблема очистки сточных вод от производственных отходов, так как они значительно ухудшают качество воды. Такими производственными загрязнениями могут быть органические соединения. Наиболее токсичным органическим соединением является формальдегид. Для уменьшения концентрации формальдегида в сбрасываемых водах на предприятиях применяют разные способы: грануляция ила, иммобилизация активного ила на плавающих и стационарных загрузках в виде биопленок и др.

Целью данной работы является изучение культуры микроорганизмов, с помощью которых возможна биологическая очистка сточных вод от формальдегида.

Чистая культура микроорганизмов, полученная после омоложения, имеет морфологические признаки, представленные в табл. 1 [1].

Таблица 1

Морфологические признаки культуры микроорганизмов

Признак	1	2	3	4	5
Форма колонии	Ризоидная	Круглая, с фес-тончатым краем	Ризоидная	Круглая	Круглая
Размер	5,5 мм	5 мм	6 мм	3 мм	2 мм
Оптические свойства	Непрозрачная	Непрозрачная	Непрозрачная	Прозрачная	Непрозрачная
Цвет	Светло-желтый	Бежевый	Белый	Светло-желтый	Желтый
Поверхность	Матовая	Глянцевая	Глянцевая	Матовая	Матовая
Профиль	Плоский	Бугристый	Плоский	Плоский	Выпуклый
Край колонии	Гладкий	Волнистый	Гладкий	Гладкий	Гладкий
Структура колонии	Однородная	Однородная	Однородная	Однородная	Однородная

С помощью микроскопирования был определен грамм-тип исследуемой культуры микроорганизмов – грамположительный, о чем свидетельствует характерный фиолетовый цвет клеток. В качестве эталона сравнения была принята культура *E.coli*, она имеет грамотрицательный тип, клетки данной культуры окрашены в розовый цвет (рис. 1, 2) [2].

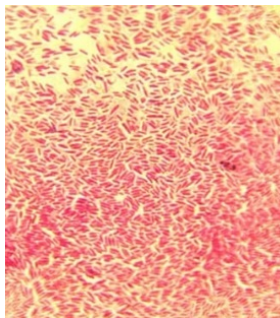


Рис. 1. Микроскопирование *E.coli*

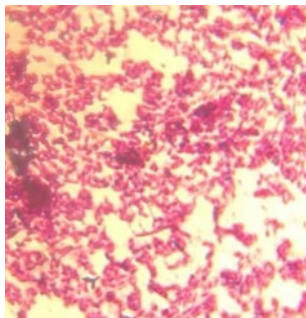


Рис. 2. Микроскопирование исследуемой культуры

Диско-диффузионным методом чувствительности микроорганизмов оценивали угнетающее действие формальдегида на исследуемую культуру микроорганизмов. Рассматривали наличие или отсутствие зоны угнетения и ее размер. Данные, полученные в ходе экспериментов, представлены в табл. 2 [3].

Таблица 2

Оценка степени чувствительности
микроорганизмов к формальдегиду

Концентрация формальдегида	Диаметр сектора, мм	Оценка степени чувствительности
100 мг/л	—	Нечувствительные
2,5 г/л	10	Устойчивые
3,5 г/л	13	Малочувствительные
4,5 г/л	18	Чувствительные
5,0 г/л	20	Чувствительные

Для изучения скорости роста представленных культур микроорганизмов построены кривые роста при различных концентрациях формальдегида в питательной среде как зависимости логарифма оптической плотности от времени (рис. 3).

По построенным графикам были найдены значения максимальной удельной скорости роста [4].

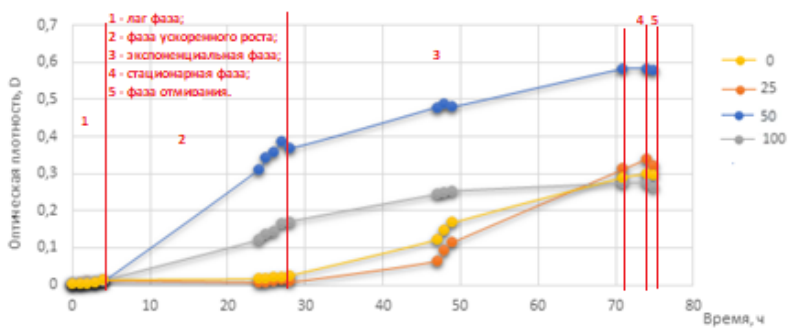


Рис. 3. Кривые роста микроорганизмов на средах с различным содержанием формальдегида

Результатом построения серии кривых роста на средах с различным содержанием формальдегида (от 0 до 100 мг/л) стало уста-

новление удельных скоростей роста микроорганизмов для исследуемых культур.

Значения максимальной удельной скорости роста: при концентрации формальдегида 0 мг/л – 0,0070 ч⁻¹, при 25 мг/л – 0,0071 ч⁻¹, при 50 мг/л – 0,0077 ч⁻¹, при 100 мг/л – 0,0074 ч⁻¹.

Таким образом, можно сделать вывод: для исследуемой культуры микроорганизмов максимальная удельная скорость роста равна 0,0077 ч⁻¹ на среде, которая содержит 50 мг/л формальдегида и 0,0074 ч⁻¹ при концентрации формальдегида 100 мг/л.

Поскольку основной целью выделенных микроорганизмов является поглощение формальдегида, именно он используется в качестве источника питания. Концентрация формальдегида от 50 до 100 мг/л является оптимальной для роста данной культуры, концентрация 100 мг/л уже незначительно ингибирует скорость роста, а меньшая – не дает микроорганизмам достаточного питания и скорость роста невысокая.

Список литературы

1. Глебова М.А., Семенова Е.Н., Бахирева О.И. Иммобилизация активного ила как способ интенсификации биологической очистки сточных вод // Химия. Экология. Урбанистика: материалы Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых, аспирантов, студентов и школьников (с международным участием). – Пермь, 2019. – С. 372–376.
2. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология: учеб. для вузов. – 3-е изд., испр. – М.: Академия, 2009. – 352 с.
3. Сидоренко С.В., Колупаев В.Е. Антибиотикограмма: Диск-диффузионный метод. Интерпретация результатов: брошюра. – М.: Русский медицинский журнал, 2010.
4. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. – М.: КолосС, 2004. – 296 с.

Об авторах

Лобанова Анастасия Андреевна – студентка, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: LobanovaNNN3@yandex.ru.

Бахирева Ольга Ивановна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: vvv@pstu.ru.

Я.В. Лобанова, А.А. Ботева

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПОФИЛЬНЫХ КСЕНОБИОТИКОВ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ ПРИ ОЦЕНКЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ПОЛЛЮТАНТОВ

Липофильность органических молекул – один из важных физико-химических параметров, определяющих результат их взаимодействия с биологическими системами, в то же время осложняющий получение репрезентативных результатов при оценке их свойств, особенно в тестовых системах *in vitro* на основе водной среды. Представлены результаты экспериментов по исследованию метаболической стабильности флуоренона с использованием фракции S9 печени лабораторной крысы. Подбираются оптимальные условия и расчеты для получения действительных и воспроизводимых результатов.

Ключевые слова: поллютант, липофильность, биотрансформация, метаболизм, S9

Ya.V. Lobanova, A.A. Boteva

INTERACTION OF LIPOPHILIC XENOBIOTICS WITH BIOLOGICAL SYSTEMS IN THE ASSESSMENT OF METABOLIC STABILITY OF POLLUTANTS

Lipophilicity of organic molecules is one of the important physicochemical parameters that determine the result of their interaction with biological systems. However, this parameter complicates obtaining representative results when assessing the properties of molecules, especially in *in vitro* test systems in water. Below are the results of experiments on the study of metabolic stability of fluorenone using the liver S9 fraction of the laboratory rat. Optimal conditions and calculations are selected to obtain valid and reproducible results.

Keywords: pollutant, lipophilicity, biotransformation, metabolism, S9.

Биотрансформация гидрофобных органических веществ представляет значительный интерес, поскольку их устойчивость в окружающей среде, потенциал биоаккумуляции и токсичность в большой степени определяются скоростью их метаболической трансформации. Наиболее адекватной моделью являются тесты *in vivo* на лабораторных животных, однако продолжительность эксперимента, его высокая стоимость, а также этические вопросы о

нецелесообразности избыточного использования животных делают такие эксперименты выбором для углубленного исследования. На первых этапах целесообразно использовать тестовые системы *in vitro*: на основе клеток, субклеточных фракций или отдельных ферментов. Скорость и дешевизна при достаточной релевантности получаемых результатов вывели эти методы на первый план в современных исследованиях.

Однако следует учитывать химическую природу и физико-химические свойства молекул поллютантов при отработке методики для оценки метаболической стабильности веществ [1]. К примеру, липофильность субстрата как один из факторов, влияющих на скорость его метаболизма, является важной частью в изучении метаболического клиренса с участием ферментов. Сорбция гидрофобных органических соединений клеточными матрицами высока ввиду их липофильности, что существенно влияет на доступность молекулы поллютанта для контакта с ферментами и в целом на кинетику их ферментативной трансформации в тест-системах по оценке метаболизма *in vitro*.

Экспериментальная часть

Для оценки метаболической стабильности липофильных соединений использовали свежеприготовленную фракцию S9 гомогената печени лабораторных крыс стока SD по стандартной процедуре [2], а в качестве модельного соединения нами выбрано соединение со средним значением липофильности – флуоренон ($\log P$ 2.88 [3]).

В пробирки Эппендорфа вносили фракцию S9 и раствор флуоренона в конечных концентрациях 1 мг/мл и 50 мкМ соответственно и инкубировали при 37 °C в присутствии или отсутствии кофакторов NADPH и GSH в концентрации 1 мМ. В ходе инкубирования отбирали аликвоты всех проб через 0, 60, 90, 120 мин. К каждой аликвоте добавляли холодный ацетонитрил для остановки реакции и осаждения ферментов, центрифугировали. Осадок оставляли для последующих операций, надосадочную жидкость отбирали, вносили в вials. Полученные образцы анализировали на ВЭЖХ-системе Shimadzu Prominence XR с детектором SPD-M20A на колонке Shim-pack XR-ODS II 2.0 mm i. d x 75 mm. Осадок суспендировали в ацетонитриле и обрабатывали ультразвуком в течение 1,5 мин. Далее завершали подготовку пробы аналогично. Отно-

сительное содержание исходного вещества и предполагаемых метаболитов оценивали по площади пика на хроматограмме.

Полученные результаты

Полученные в результате эксперимента зависимости позволяют предположить, что содержание исходного вещества довольно быстро уменьшается (рис. 1). При этом уменьшается как в образцах, содержащих кофакторы, так и не содержащих их.

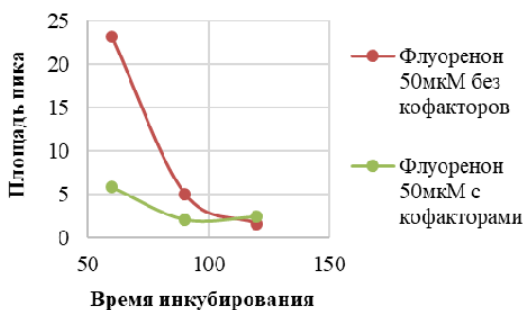


Рис. 1. Изменение содержания флуоренона в пробе от времени инкубации

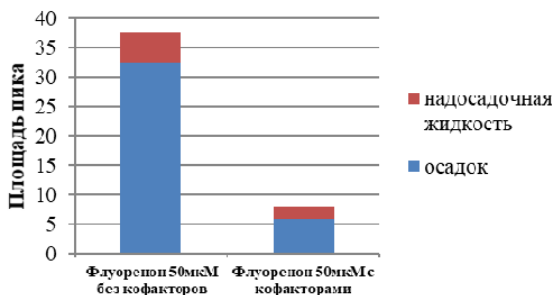


Рис. 2. Содержание флуоренона в надосадочной жидкости и в осадке после инкубирования 90 мин

Резкое снижение содержания вещества в пробе, не содержащей кофакторов, не может быть объяснено ускорением его трансформации в условиях эксперимента. Сравнение содержания флуоренона в образце 90-минутной инкубации при стандартной обра-

ботке реакционной массы и в осадке при дополнительном воздействии ультразвуком показывает, что основное количество вещества содержится в осадке, причем данное явление более выражено для образцов, не содержащих кофакторы (рис. 2).

Заключение

В ходе исследования были получены данные о влиянии стадии подготовки пробы к измерениям на результаты оценки метаболической стабильности липофильного соединения с использованием фракции S9. По предварительным результатам можно предположить, что молекулы флуоренона могли образовать комплексы с малорастворимыми белковыми и липидными компонентами фракции S9 или быть сорбированы ими, благодаря чему вещество удерживается в осадке. Дополнительная обработка ультразвуком высвобождает вещество и делает доступным для детектирования. Однако для оптимизации метода и получения воспроизводимых результатов исследования будут продолжаться.

Исследование проведено при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках реализации программы деятельности научно-образовательного центра мирового уровня «Рациональное недропользование».

Авторы выражают благодарность канд. хим. наук О.П. Красных за помощь при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Kwon J.H., Lee H.J., Escher B.I. Bioavailability of hydrophobic organic chemicals on an in vitro metabolic transformation using rat liver S9 fraction // *Toxicology in Vitro*. – 2020. – No. 66. – P. 104835.
2. Wu W-N, McKown L.A. In vitro drug metabolite profiling using hepatic S9 and human liver microsomes / Yan Z, Cadwell GW (eds.) // *Optimization in Drug Discovery. Methods in Pharmacology and Toxicology*. – 2004. – P. 163–184.
3. ChemOffice (Ultra Version 9.0) – пакет программных средств фирмы CabridgeSoft Corporation, 2005.

Об авторах

Лобанова Яна Викторовна – младший научный сотрудник лаборатории рационального природопользования и природоподобных технологий, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: lobanich.i@gmail.com.

Ботева Анастасия Андреевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», научный сотрудник лаборатории рационального природопользования и природоподобных технологий, Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: aboteva@pstu.ru.

А.С. Лопатина, А.Ю. Максимов

**БИОСИНТЕЗ ИНДОЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ
БАКТЕРИЯМИ РОДА *AZOSPIRILLUM* В ЗАВИСИМОСТИ
ОТ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Посвящена изучению влияния различных факторов среды (температура, pH, концентрация триптофана) на биосинтез индол-3-уксусной кислоты (ИУК) штаммами *Azospirillum*, выделенными из почвы Пермского края. Штамм *Azospirillum* sp. (2) показал лучшую продукцию ИУК при pH = 7 и температуре 30 °C (67,5 мкг/мл). Установлено, что оптимальная концентрация триптофана составляет 500 мкг/мл.

Ключевые слова: *Azospirillum*, индолил-3-уксусная кислота, эндофитные бактерии, триптофан.

A.S. Lopatina, A.Y. Maksimov

**BIOSYNTHESIS OF INDOLE-3-ACETIC ACID
BY *AZOSPIRILLUM* DEPENDING ON THE CULTIVATION
CONDITIONS**

This work is devoted to the study of the influence of various environmental factors (temperature, pH, tryptophan concentration) on the biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) by *Azospirillum* strains isolated from the soil of the Perm region. The strains *Azospirillum* sp. (2) showed better IAA production at pH 7 and temperature 30°C (67,5 mcg /ml). The optimal tryptophan concentration is 500 mcg/ml.

Keywords: *Azospirillum*, indolyl-3-acetic acid, endophytic bacteria, tryptophan.

Эндофитные бактерии обитают в живой ткани растений, образуя симбиоз: растение-хозяин предоставляет защищенные ниши для существования эндофитов, которые в свою очередь обеспечивают растение важными метаболитами [1]. Бактерии рода *Azospirillum* способны стимулировать рост и развитие растений за счет нескольких механизмов, но наиболее значимым из них является синтез фитогормонов.

Индол-3-уксусная кислота является одним из основных фитогормонов, поскольку участвует во многих процессах роста и развития растений. Под воздействием бактериальной ИУК увеличивается длина корня, количество боковых корней и корневых волос-

ков. Это способствует более полному поглощению питательных веществ растением из окружающей среды [1].

Известно, что биосинтез ИУК микробными изолятами варьируется и зависит от условий культивирования. Целью настоящего исследования является определение оптимальных условий (температура, pH, концентрация триптофана), при которых продукция ИУК азоспириллами является максимальной.

Материалы и методы исследований

Подготовка образцов. Объектами исследования являются эндофитные штаммы *Azospirillum*, выделенные из корневой системы *Pulmonaria obscura* (медуница неясная), собранной в Пермском крае (правобережной части пригорода г. Перми) в 2018 г. Штамм (2) – *Azospirillum* sp., штамм (3) – *Azospirillum canadense*.

Колориметрический метод определения ИУК. Изоляты культивировали в среде LB [2] при 30 °C и pH = 7 в течение 4 дней. Затем культуральную жидкость центрифугировали в течение 15 мин при 5000 об./мин, 1 мл надосадочной жидкости смешивали с 2 мл реагента Сальковского (2 мл 0,5 М FeCl₃ + 98 мл 35 % раствора HClO₄) и выдерживали в темноте. Развитие розовой окраски указывало на присутствие ИУК в растворе. Оптическая плотность (OD) регистрировалась при 530 нм на спектрофотометре через 30 минут. Неинокулированную среду LB использовали в качестве отрицательного контроля. Концентрацию ИУК определяли с использованием калибровочного графика в соответствии со следующим уравнением: $y = 0,0030x - 0,0041$.

Оптимизация условий культивирования. В качестве инокулята использовали 1 мл суспензии односуточной культуры азоспирилл в концентрации 1×10^7 кл / мл. Штаммы азоспирилл культивировали в среде LB с добавлением триптофана (100, 200, 500 мкг/мл). pH среды изменялся в диапазоне от 5 до 9. Колбы с культурой инкубировали в течение 4 дней при 25, 30 и 37 °C. Количественную оценку продукции ИУК проводили с помощью стандартного графика.

Результаты и их обсуждение

Показано, что исследуемые штаммы обладают различной способностью к биосинтезу ИУК на среде LB без добавления трип-

тофана. Самая высокая концентрация ИУК наблюдалась в культуральной жидкости штамма (2) и составляла 42,5 мкг/мл, в то время как концентрация ИУК в культуральной жидкости штамма (3) была практически в 1,5 раза меньше и составляла 27,1 мкг/мл. Тем не менее при сравнении полученных результатов с литературными данными оба штамма можно отнести к эффективным продуцентам данного фитогормона. Имеются литературные данные о том, что в культуральной жидкости штамма 43 бактерий рода *Azospirillum* содержится до 8,8 мг/л ИУК, а в культуральной жидкости бактерий *Azospirillum brasilense* Sp – 7,15 мг/л ИУК [3].

Продукция ИУК бактериями во многом зависит от условий окружающей среды. Известно, что добавление в питательную среду L-триптофана может увеличить биосинтез ИУК в 2,7 раз [3]. Триптофан – это аминокислота с индольной группой, которая может выступать в качестве предшественника ИУК в растениях и микроорганизмах. У бактерий, ассоциированных с растениями, биосинтез ИУК может быть инициирован присутствием L-триптофана в корневых экссудатах растений.

В ходе нашего исследования было обнаружено, что триптофан увеличивает выработку индол-3-уксусной кислоты. При этом максимальный выход ИУК наблюдался для штамма (2) при концентрации триптофана 500 мкг/мл и составил 67,5 мкг/мл (рис. 1), что в 1,5 раза выше, чем в среде без добавления триптофана. Для штамма (3) при добавлении 100 и 200 мкг/мл триптофана также наблюдалось повышение выхода фитогормона. Однако концентрация аминокислоты 500 мкг/мл оказала ингибирующее действие: выход ИУК снизился в 2,2 раза по сравнению со средой, свободной от триптофана. Ввиду этого для дальнейших исследований влияния температуры и pH на продукцию фитогормона штаммом (3) в питательную среду вносили триптофан в концентрации 200 мкг/мл.

Определено влияние различных уровней pH в диапазоне от 5 до 9 на продукцию ИУК. Установлено, что штамм (2) способен синтезировать значительное количество ИУК во всем диапазоне pH (рис. 2). Максимальный выход фитогормона наблюдался при pH = 7 и составлял 67,5 мкг/мл. Отклонения pH в сторону кислотной и щелочной среды вызывали незначительное снижение выхода ИУК.

Показано, что штамм (3) синтезирует 18,1 мкг/мл ИУК при pH = 5. Максимальное количество фитогормона выделялось в среде

при рН = 6 и составляло 32,4 мкг/мл, а с увеличением рН продукция ИУК значительно сокращалась.

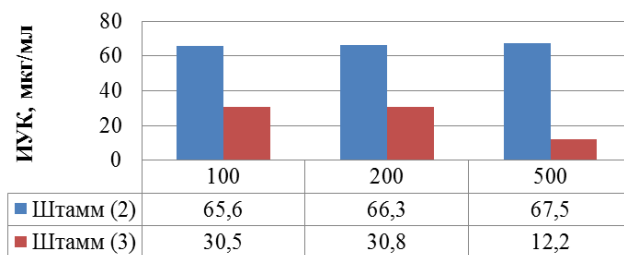


Рис. 1. Продукция ИУК азоспириллами при различных концентрациях триптофана (100, 200 и 500 мкг/мл)

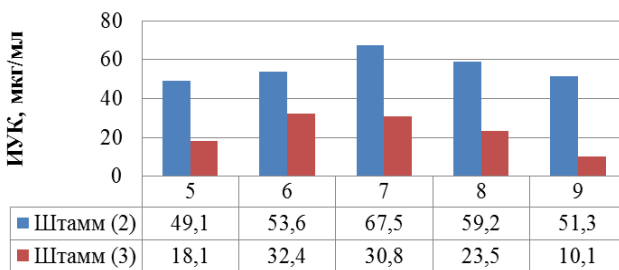


Рис. 2. Продукция ИУК азоспириллами в диапазоне рН от 5 до 9

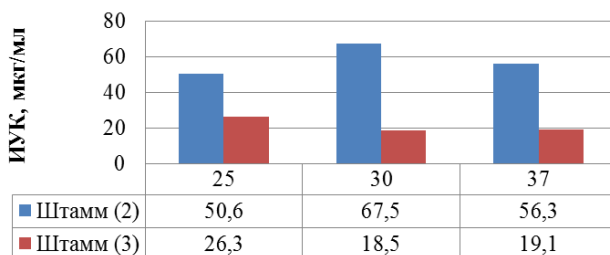


Рис. 3. Продукция ИУК азоспириллами при температуре 25, 30 и 37 °C

Изучено влияние температуры (25, 30 и 37 °C) на продукцию ИУК. Максимальный выход фитогормона (67,5 мкг/мл) наблюдался при культивировании штамма (2) при температуре 30 °C (рис. 3).

У штамма (3) температура влияла на начало продукции ИУК. При 25 и 30 °С ИУК обнаруживалась в культуральной жидкости уже через 24 ч культивирования, а температура 37 °С вызывала задержку продукции фитогормона, который обнаруживался только после 48 ч инкубации. Максимальная продуктивность штамма (3) наблюдалась при 25 °С (26,3 мкг/мл).

Таким образом, полученные результаты показывают, что изменение температуры и pH незначительно влияет на продукцию ИУК штаммом (2) в среде LB с добавлением триптофана (500 мкг/мл). Это указывает на стабильность биосинтеза ИУК данным штаммом в различных условиях, что является важной особенностью для практического применения биопрепаратов на основе этих бактерий в агробиотехнологии.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации АААА-А19-119051390040-5.

Список литературы

1. Sarwar M., Arshad M., Martens D.A. Tryptophan-dependant biosynthesis of auxins in soil // Plant Soil. – 1992. – Vol. 147. – P. 207–215.
2. Rodriguez-Caceres, Enrique A, Improved medium for isolation of *Azospirillum spp.* // Appl. Environ Microbiol. – 1982. – Vol. 44, no. 4. – P. 990–991.
3. Hafeez F.Y., Yasmin S., Ariani D. Plant growth promoting bacteria as biofertilizer // Agronomy for Sustainable Development. – 2006. – Vol. 26, no. 2. – P. 143–150.

Об авторах

Лопатина Анастасия Сергеевна – магистрант кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: a.s.lopatina97@gmail.com.

Максимов Александр Юрьевич – кандидат биологических наук, доцент, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, e-mail: almaks1@mail.ru.

О.Ю. Маньковская, О.И. Бахирева, М.М. Соколова

**ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ
ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА**

Преставлены результаты расчета максимальной скорости роста клеток микроорганизмов, которые зависят от добавленной в питательную среду концентрации субстрата. В качестве субстрата был использован дрожжевой экстракт, как один из компонентов мясопептонного бульона. На основании экспериментальных данных была рассчитана константа диссоциации культурально-субстратного комплекса, выведено общее уравнение зависимости максимальной удельной скорости роста клеток микроорганизмов от концентрации субстрата. Благодаря полученным данным становится возможным рассчитать условия протекания технологического процесса с максимальной выгодой.

Ключевые слова: микроорганизмы, никель, кинетические закономерности.

O.Y. Mankovskaya, O.I. Bakhireva, M.M. Sokolova

**STUDY OF THE KINETIC REGULARITIES OF THE PROCESS
OF CULTIVATION OF MICROORGANISMS DEPENDING
ON THE CONCENTRATION OF THE SUBSTRATE**

This article presents the results of calculating the maximum growth rate of microorganism cells, which depend on the substrate concentration added to the nutrient medium. Yeast extract was used as a substrate, as one of the components of meat-peptone bull (BCH). Based on the experimental data, the dissociation constant of the culture-substrate complex was calculated, and a general equation was derived for the dependence of the maximum specific growth rate of microbial cells on the substrate concentration. Thanks to the data obtained, it becomes possible to calculate the conditions for the flow of the technological process with maximum benefit.

Keywords: microorganisms, nickel, kinetic laws.

Главным критерием для питательной среды в процессе культивирования микроорганизмов является наличие источника энергии. Если для фототрофов таким источником служит солнечная энергия, то для хемолиттрофов и хемоорганотрофов это неорганические и органические субстраты соответственно. Необходимо учитывать, что при использовании углекислого газа в качестве

единственного источника углерода возможно варьирование синтетических способностей клеток микроорганизмов [1, 2].

Влияние состава питательной среды на скорость роста микроорганизмов изучали, используя омоложенную культуру микроорганизмов, выделенную из почвы, которая была загрязнена тяжелыми металлами (ТМ) [3, 4]. Культивирование проводили в МПБ с добавлением различного количества дрожжевого экстракта в качестве субстрата (S) в концентрациях 25, 30 и 35 г/100 мл. Полученные скорости роста в ходе эксперимента равны 0,197; 0,210 и 0,213 ч⁻¹ соответственно.

Изучение кривых роста культуры проводили при разных концентрациях субстрата. Таким образом, стало возможным построить зависимость в координатах: скорость роста клеточной биомассы (v) – концентрация дрожжевого экстракта [S] (рис. 1).

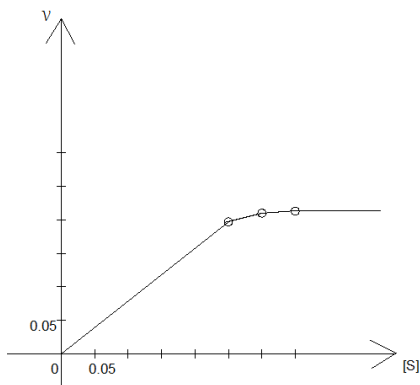


Рис. 1. Зависимость скорости роста клеток от концентрации субстрата

Согласно модели Михаэлиса, в процессе культивирования микроорганизмов образуется промежуточный комплекс (ES), внутримолекулярные превращения которого ведут к образованию продуктов реакции [5].



где $[E]$ – культура микроорганизмов; $[S]$ – субстрат; $[ES]$ – культурально-субстратный комплекс; $[P]$ – продукт реакции; K_m – константа диссоциации культурально-субстратного комплекса (кон-

станта Михаэлиса); K – константа скорости реакции превращения культурально-субстратного комплекса в фермент и продукт.

Уравнение Михаэлиса – Ментена позволяет экспериментально определять значения констант K_m и K , которые являются важными характеристиками ферментативных реакций.

Анализируя процесс поглощения ионов никеля изучаемой культурой в присутствии разных концентраций субстрата, по экспериментальным данным с использованием метода координат Лайнуивера – Берка получили зависимость, представленную на рис. 2.

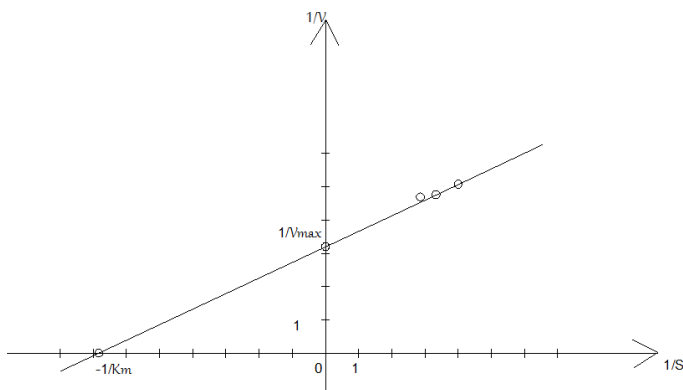


Рис. 2. Графическая зависимость скорости роста клеток от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера – Берка

Общая зависимость максимальной скорости роста клеток микроорганизмов от концентрации субстрата имеет вид

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{K[E][S]} + \frac{1}{K[E]} = \frac{K_m}{v_{\max}[S]} + \frac{1}{v_{\max}},$$

$K[E]$ – максимальная удельная скорость роста клеток микроорганизмов, $K[E] = v_{\max}$;

Из графических зависимостей получаем

$$-\frac{1}{K_m} = -6,831,$$

$$K_m = 0,146 \text{ г/мл};$$

$$\frac{1}{v_{\max}} = 3,20,$$

$$v_{\max} = 0,312 \text{ ч}^{-1}.$$

Полученные кинетические закономерности, описывающие процесс культивирования микроорганизмов в присутствии ионов никеля и различных концентраций дрожжевого экстракта, позволяют определить максимальную скорость роста клеток, которая равна $0,312 \text{ ч}^{-1}$, константу диссоциации культурально-субстратного комплекса ($K_m = 0,146 \text{ г/мл}$). В целом можем сделать вывод, что выделенная культура микроорганизмов является вполне технологичной и может быть применима в производственной схеме доочистки стоков от ионов никеля.

Список литературы

1. Ворончихина Е.А., Блинов С.М., Меньшикова Е.А. Технофильные металлы в естественных и урбанизированных экосистемах Пермского края // Экология урбанизированных территорий. – 2013. – № 1. – С. 103–108.
2. Pimneva L.A., Koroleva M.N. Sorption treatment of industrial wastewater from manganese and nickel ions // International Journal of Experimental Education. – 2015. – No. 3–2. – P. 83–84.
3. Изучение методов доочистки производственных растворов от ионов никеля / О.Ю. Маньковская, О.И. Бахирева, М.М. Соколова, Л.С. Пан // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология. – 2019. – № 3. – С. 18–28.
4. Маньковская О.Ю., Бахирева О.И., Соколова М.М. Изучение кинетики ингибирующего действия ионов никеля на культуру микроорганизмов // Химия. Экология. Урбанистика. – 2020. – Т. 2. – С. 18–22.
5. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. – М.: Колос С, 2004. – 295 с.

Об авторах

Маньковская Ольга Юрьевна – магистрант кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: manechkaolka2212@gmail.com.

Бахирева Ольга Ивановна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: bahirevy@mail.ru.

Соколова Мария Михайловна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: mmsokolova@mail.ru.

Л.А. Миссорина, А.Ю. Максимов

**ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММА, РАЗЛАГАЮЩЕГО ЭФИРЫ
ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ, И ИЗУЧЕНИЕ БИОКИНЕТИКИ
РАЗЛОЖЕНИЯ ДИМЕТИЛФТАЛАТА И ДИБУТИЛФТАЛАТА**

Бактериальный штамм, способный использовать диметилфталат (DMP) и дибутилфталат (DBP) в качестве единственного источника углерода и энергии, был выделен из почвы г. Березники. Кинетику разложения исследовали при различных начальных концентрациях. Показано, что кинетика описывается схемой ингибирования субстрата по механизму неактивного тройного комплекса.

Ключевые слова: ЭФК, диметилфталат, дибутилфталат, кинетика биодеструкции.

L.A. Missorina, A. Yu Maksimov

**ISOLATION OF A STRAIN THAT DECOMPOSES PHTHALIC ACID
ESTERS AND A STUDY OF THE BIOKINETICS OF DECOMPOSITION
OF DIMETHYL PHTHALATE AND DIBUTYL PHTHALATE**

In this study, an isolated bacterial strain capable of using dimethyl phthalate (DMP) and dibutyl phthalate (DBP) as the sole source of carbon and energy was isolated from the soil of Berezniki. Decomposition kinetics were performed at various initial concentrations. The results showed that the kinetics is described by the scheme of substrate inhibition by the mechanism of an inactive ternary complex.

Keywords: PAE, dimethyl phthalate, dibutyl phthalate, biokinetics.

Сложные эфиры фталевой кислоты (ЭФК) представляют собой класс соединений, широко используемых в качестве пластификаторов для придания смолам и пластикам механической прочности и гибкости [1]. Проблеме поступления некоторых из ЭФК в последние годы уделяется больше внимания, поскольку они считаются соединениями, которые нарушают обмен эстрогена и могут быть токсичными для репродуктивной системы. Исследования на животных доказали, что ЭФК могут вызывать повторные аборт и мужское бесплодие. Кроме того, предполагается, что некоторые ЭФК являются мутагенами и канцерогенами [2]. Выделяют несколько

приоритетных загрязнителей эфиров фталевой кислоты: диметилфталат (ДМФ), диэтилфталат (ДЭФ), бензилбутилфталат (ББФ), ди-*n*-бутилфталат (ДБФ) и ди-(2-этил)гексилфталат (ДЭГФ).

Поскольку эфиры не связываются ковалентно со смолой пластика, они могут мигрировать в окружающую среду во время использования или утилизации. Из-за их низкой растворимости в воде и высоких коэффициентов распределения октанол – вода они имеют тенденцию накапливаться в почве, донных отложениях или воде. К сожалению, из-за своей химической структуры фталаты не могут быть качественно удалены естественными процессами, такими как гидролиз и фоторазложение. Метаболическое разложение ЭФК микроорганизмами считается одним из основных путей разложения в окружающей среде этого широко распространенного класса загрязнителей [3].

Цели данной работы: выделить культуру, способную к разрушению фталатов, изучить биокинетику разложения микроорганизмами диметилфталата и дибутилфталата.

Материалы и методы исследования

Субстраты и компоненты сред. Диметилфталат и дибутилфталат (Sigma-Aldrich, США) были использованы в качестве субстрата. Все другие химические вещества, использованные в этом исследовании, были коммерчески доступными и имели аналитическую чистоту.

Питательные среды для культивирования микроорганизмов. Для накопления культуры использовали минеральную питательную среду *N* следующего состава на 400 мл, г/л: 0,2 – NaCl, 1,5 – KН₂РO₄, 0,4 – K₂НРO₄. На 400 мл среды вносили 1 мл раствора солей двухвалентных металлов и микроэлементов и 1 мл 1 М NH₄Cl как источника азота. Для выделения чистой культуры использовали богатую плотную питательную среду – рыбо-пептонный бульон, для приготовления которого на 400 мл готовой среды вносили, г/л: 14 – питательный агар сухой, 4 – бактериологический агар.

Выделение бактерий, разрушающих эфиры фталевой кислоты. Для селекции биодеструкторов фталевых эфиров использовали метод накопительных культур. Для получения накопительной культуры использовали среду *N*, содержащую 0,25 % диэтилфталата в качестве единственного источника энергии и углерода. Наиболее активная культура микроорганизма была выделена из почвы

долины р. Лёнва (г. Березники, Пермский край). Для получения чистой культуры использовали метод Коха. Изолят, способный наиболее активно расти в присутствии ДЭФ, был обозначен П4.

Идентификация штамма П4. Идентификацию штамма П4 проводили путем ПЦР-амплификации и секвенирования гена 16S-рРНК. Геномную ДНК штамма П4 выделяли щелочным методом, путем обработки 0,01М-ным раствором NaOH с биомассой, с последующим чередованием температур. Амплификацию гена 16S-рРНК проводили с универсальными праймерами 27F/1492R. Амплифицированный продукт ПЦР анализировали путем электрофореза в полиакриламидном геле.

Кинетика разложения эфиров фталевой кислоты. Для исследования разложения диметилфталата, дибутилфталата в различных концентрациях штамм П4 инокулировали в среду *N* и инкубировали при 25 °С, при 140 об/мин. Образцы для анализа собирали каждые 24 ч количество субстрата и продуктов реакции определяли методом ВЭЖХ на колонке C18 при элюции ацетонитрилом.

Результаты и их обсуждение

Идентификация и характеристика бактериального штамма П4. Выделенная культура грамположительна, имеет палочковидную форму клеток без жгутиков. Морфология колонии на РПА после культивирования в течение 18–24 ч: плоские, ризоидные, диаметром 3–4 мм, белого цвета, непрозрачные. Выделенная культура по совокупности признаков была предварительно идентифицирована как *Bacillus* sp.

Кинетика разложения ДМФ, ДБФ. Согласно классическому уравнению Михаэлиса – Ментен, при увеличении концентрации субстрата начальная скорость реакции возрастает, стремясь к максимальной скорости. В табл. 1 представлены исследуемые концентрации ДМФ и ДБФ и полученная удельная скорость роста микроорганизмов.

Кинетика биodeградации фталатов объяснена путем анализа графика удельной скорости роста микроорганизмов и концентрации ДМФ, ДБФ. Кривая имеет вид параболы, следовательно, в ходе реакции присутствует ингибирование роста культуры микроорганизма субстратом. Также кривая имеет куполообразную симметричную форму, следовательно, реакция при ингибировании субстратом протекает по механизму тройного комплекса, симметричный купол говорит о том, что тройной комплекс неактивный.

Таблица 1

Исследуемые концентрации диметилфталата и дибутилфталата
и удельная скорость роста микроорганизмов

Концентрация диметилфталата, об. %	Удельная скорость роста, ч ⁻¹	Концентрация дибутилфталата, об. %	Удельная скорость роста, ч ⁻¹
0,005	0,0012	0,005	0,0004
0,01	0,0009	0,01	0,0006
0,03	0,0009	0,03	0,0007
0,1	0,0104	0,1	0,0010
0,3	0,000 30	0,3	0,0108
0,9	0,0002	0,9	0,0001

Уравнение удельной скорости ингибирования субстратом по механизму тройного комплекса:

$$V = K_s [ES] = K_s \frac{[E_0][S]}{K_s \left(1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S^2]}{K_s' K_s} \right)} \rightarrow V = \frac{V_{\max} [S]}{K_s + [S] + \frac{[S^2]}{K_s'}}$$

где V – удельная скорость роста микроорганизма, $V_{\max}$ – максимальная удельная скорость роста микроорганизма, S – концентрация субстрата, K_s – константа сродства к субстрату, K_s' – кажущаяся константа сродства к субстрату.

Рассчитанные кинетические параметры по уравнению представлены в табл. 2.

Таблица 2

Расчетные параметры при изучении кинетики

Вещество	Расчетная K_s , моль/л	Расчетная $V_{\max}$, ч ⁻¹	Расчетная K_s	Оптимальная концентрация, об. %
ДМФ	0,0019	0,4800	0,00056	0,1
ДБФ	0,0225	0,0545	0,0015	0,3

Заключение

Селекционирована культура бактерий, перспективная для биологической деструкции фталатов. Показано, что выделенный изолят способен к эффективному биологическому разложению вы-

бранных фталатов, а диметилфталат является наилучшим субстратом, так как обеспечивает максимальную удельную скорость роста по сравнению с дибутилфталатом.

При изучении кинетики биodeградации диметилфталата, дибутилфталата с помощью микроорганизмов установлено, что повышение концентраций эфиров фталевой кислоты до определенного значения ингибирует рост микроорганизмов, во всех случаях ингибирование происходит по механизму тройного комплекса, при этом тройной комплекс неактивен.

Работа выполнена в рамках государственного задания АА-АА-А19-119112290009-1.

Список литературы

1. Kumar V., Maitra S.S. Biodegradation of endocrine disruptor dibutyl phthalate (DBP) by a newly isolated *Methylobacillus* sp. V29b and the DBP degradation pathway // 3 Biotech. – 2016. – Vol. 6. – P. 200.
2. Biodegradation of dimethyl phthalate, diethyl phthalate and di-n-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. L4 isolated from activated sludge / Y. Lu, F. Tang, Y. Wang [et al.] // Journal of Hazardous Materials. – 2009. – Vol. 168 (2-3). – P. 938–943.
3. The efficient biodegradation of dimethyl phthalate using an anaerobic bioelectrochemical system / Y. Zhou [et al.] // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2019. – Vol. 94. – P. 2935–2943.

Об авторах

Миссорина Любовь Александровна – магистрант кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: lyuba.missorina@yandex.ru.

Максимов Александр Юрьевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: almaks1@mail.ru.

В.С. Новоселова, Е.А. Фарберова,
Г.А. Старкова, А.С. Максимов

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ БИОХИМИЧЕСКОГО КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ЕВРОПИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ СОРБЕНТОВ

РЗЭ широко используются в самых разнообразных областях промышленности. Химическое извлечение данных элементов сопряжено с определенными проблемами. Рассмотрено влияние европия на рост микроорганизмов рода *Bacillus*, изучена способность европия сорбироваться волокнистыми углеродными сорбентами и группами активных углей, проведены исследования по распределению европия между биомассой и культуральной жидкостью.

Ключевые слова: редкоземельные металлы, лантаноиды, европий, микроорганизмы, сорбция, активные угли, волокнистые углеродные сорбенты.

V.S. Novoselova, E.A. Farberova, G.A. Starkova, A.S. Maksimov

INVESTIGATION OF THE POSSIBILITY OF BIOCHEMICAL CONCENTRATION OF EUROPIUM ON SURFACE OF CARBON SORBENTS

REE is widely used in a wide variety of industries. Chemical extraction of these elements is associated with certain problems. The paper considers the influence of europium on the growth of microorganisms of *Bacillus spp.*, studies the sorption properties of europium by fibrous carbon sorbents and active carbons groups, and studies on the distribution of europium between the biomass and the culture liquid.

Keywords: rare earth metals, lanthanides, europium, microorganisms, sorption, active carbons, fibrous carbon sorbents.

РЗЭ широко используются в самых разнообразных областях: атомной и реактивной технике, металлургии, стекольной, электронной и радиотехнике [1].

Рядом исследований показано, что многие микроорганизмы обладают способностью к аккумуляции металлов, однако для РЗЭ таких работ мало [2, 3].

Цель работы – подбор оптимальных условий для биоконцентрирования европия.

Объект исследований – микроорганизмы рода *Bacillus*, выделенные из образца почвы, отобранной на территории комплекса ППИ. Микроорганизмы были выделены по методу Коха на твердой питательной среде LBMedium [4]. Исследования влияния европия на рост микроорганизмов были проведены на жидкой питательной среде LBMedium. В качестве сорбентов использовались активная угольная ткань, полученная на основе целлюлозных волокон, активные угли марок АГ-5, АГ-3, БАУ-А, КАУ-А [5]. Европий представлен в виде соли – нитрата европия ($\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$).

В ходе работы было изучено влияние европия на рост микроорганизмов при введении в культуральную жидкость. Показано, что микроорганизмы не ингибируются в присутствии катиона европия (табл. 1).

Таблица 1

Экспериментальные характеристики культуры

Характеристики роста культуры	Значение для $[\text{Eu}] = 0 \text{ мг/дм}^3$	Значение для $[\text{Eu}] = 10 \text{ мг/дм}^3$
Время лаг-фазы, ч	3	3
Время ускоренной фазы, ч	14	14
Время экспоненциальной фазы, ч	28	32
Время стационарной фазы	После 45 ч культивирования	После 49 ч культивирования
Время генерации, ч	4,5	4,5
Удельная скорость роста, ч^{-1}	0,0132	0,0119

Нами было исследовано распределение катиона европия между биомассой и культуральной жидкостью в зависимости от времени культивирования микроорганизмов. Культивирование проводили в течение трех суток с концентрацией европия 20 мг/дм^3 в двух повторностях. Каждые сутки биомассу отделяли от культуральной жидкости с помощью мембранного фильтра и определяли содержание европия в биомассе и фильтрате. Результаты показали, что европий распределяется между биомассой и фильтратом в соотношении $1/8 \div 1/4$ в зависимости от условий эксперимента.

Для изучения сорбционных свойств ткани образцы поместили в 50 мл раствора европия с концентрацией 8 мг/дм^3 и временем контакта фаз 20, 40 и 60 мин. Эксперименты проведены с разной массой ткани. По результатам опыта определяли массу поглощен-

ного европия и степень извлечения европия сорбентом (табл. 2). Лучшие сорбционные свойства показала ткань массой 0,7 г при времени контакта в течение 60 мин.

Таблица 2

Исследование сорбционных свойств волокнистых углеродных сорбентов по отношению к катиону европия

Время контакта, мин	Масса поглощенного, г			Степень извлечения, %		
	$m = 0,2$ г	$m = 0,4$ г	$m = 0,7$ г	$m = 0,2$ г	$m = 0,4$ г	$m = 0,7$ г
20	0,30	0,18	0,15	75,43	44,31	37,14
40	0,27	0,17	0,23	65,66	41,52	56,86
60	0,24	0,20	0,36	58,48	48,75	88,68

Для изучения свойств активных углей навески массой 10 г поместили в 50 мл раствора европия с концентрацией 8 мг/дм³ и временем контакта фаз 20, 40 и 60 мин с каждой маркой угля. По результатам исследования было показано, что время контакта фаз и марка углей не влияют на извлечение европия из водного раствора (табл. 3).

Таблица 3

Исследование сорбционных свойств активных углей по отношению к катиону европия

Время кон- такта, мин	Сорбционная емкость, мг/г				Степень извлечения, %			
	АГ-5	АГ-3	БАУ	КАУ	АГ-5	АГ-3	БАУ	КАУ
20	0,0448	0,0448	0,0447	0,0447	99,77	99,94	99,54	99,70
40	0,0447	0,0448	0,0447	0,0448	99,64	99,84	99,65	99,74
60	0,0445	0,0448	0,0447	0,0447	99,29	99,79	99,70	99,58

Работа продолжается в направлении концентрирования европия, адсорбированного на поверхности активных углей с помощью микроорганизмов рода *Bacillus*.

Список литературы

1. Михайлов В.А. Редкоземельные металлы мира: геология, ресурсы, экономика. – Киев: Издательско-полиграфический центр «Киевский университет», 2010. – 223 с.
2. Tsuruta T. // Coll. Surfaces (B). – 2006. – Vol. 52, no. 2. – P. 117. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.04.014

3. Tsuruta T. // J. Rare Earths. – 2007. – Vol. 25, no. 5. – P. 526.
DOI: 10.1016/S1002-0721(07)60556-0
4. Atlas R.M. Handbook of microbiological media. – New York: Taylor & Francis Group, 2010. – 2037 p.
5. Тарковская И.А. Окисленный уголь. – Киев: Наукова думка, 1971. – 200 с.

Об авторах

Новоселова Вероника Сергеевна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: nikatess@yandex.ru.

Фарберова Елена Абрамовна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: elenafarb@gmail.com.

Старкова Галина Алексеевна – старший преподаватель кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: galya.starkova.2016@mail.ru.

Максимов Андрей Сергеевич – заведующий лабораторией НИОКР кафедры «Аналитическая химия и экспертиза», Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: htb03starosta@gmail.com.

Е.А. Першин, И.С. Пирожкова, И.А. Пермьякова

**ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИЯ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИДОВ
РАСТИТЕЛЬНОГО МАСЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИПАЗНЫХ
И МИКРОБНЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ**

Представлены результаты, показывающие влияние количества воды и концентрации промышленной липазы на выход продуктов реакции переэтерификации. Предложена методика выделения микробного липазного фермента. Показаны результаты переэтерификации растительного масла с использованием разных типов биокатализаторов.

Ключевые слова: липаза, триацилглицериды, переэтерификация, ферментативный катализ, биокатализ.

E.A. Pershin, I.S. Pirozhkova, I.A. Permyakova

**TRANSESTERIFICATION OF VEGETABLE OIL TRIACYLGLYCERIDES
USING LIPASE AND MICROBIAL BIOCATALYSTS**

The article presents the results that show the effect of the amount of water and the concentration of an industrial enzyme on the transesterification products yield. A method of isolating of microbial enzyme is proposed. The results of transesterification of vegetable oil using different types of biocatalysts are shown.

Keywords: lipase, triacylglycerides, transesterification, enzymatic catalysis, biocatalysis.

Липаза представляет собой водорастворимый фермент, катализирующий реакцию липолиза – ступенчатого гидролиза эфирных связей в молекулах триацилглицеридов. Данная ферментативная реакция протекает на границе раздела органической и водной фаз, что возможно благодаря наличию в структуре фермента гидрофобного участка, который отвечает за узнавание субстрата, связывание фермента с субстратом и каталитический процесс, а также гидрофильного участка, обеспечивающего растворимость фермента в водной фазе [1].

В то же время анализ литературных данных показывает возможность использования липаз в качестве катализатора реакции переэтерификации триацилглицеридов [2–4], позволяющей получать

сложные эфиры жирных кислот – ценное промышленное сырье. Применение липазного катализа позволит проводить реакцию в более мягких температурных условиях и отказаться от использования агрессивных катализаторов. Ограничение использования липаз заключается в необходимости подбора оптимальных условий получения ферментного препарата, его очистки, а также условий проведения реакции.

В качестве исследуемого ферментного препарата использовался промышленный препарат ягнячьей липазы. Реакция переэтерификации протекает в органической среде, включающей растительное масло, этанол, а также небольшую примесь воды, необходимой для функционирования фермента. Было проведено исследование влияния количества воды и концентрации ферментного препарата на выход продуктов реакции переэтерификации – сложных эфиров жирных кислот и этанола. Количество добавленной воды варьировалось в диапазоне 1–3 мас. %, концентрации фермента – 10–30 мг/мл. Количество образовавшихся этиловых эфиров жирных кислот определялось методом газовой хроматографии с использованием прибора Хроматэк-Кристалл 5000.2. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние воды и концентрации фермента на результаты реакции переэтерификации подсолнечного масла этанолом*

Количество фермента, мг/мл	Количество воды, мас. %	Количество продуктов переэтерификации, г/л	Степень конверсии масла, %
10	1	5,44	0,59
	2	3,68	0,40
	3	4,97	0,54
20	1	13,01	1,40
	2	14,42	1,55
	3	14,51	1,56
30	1	31,66	3,34
	2	29,90	3,16
	3	34,89	3,67

Примечание: * соотношение масло:этанол – 1:10 мас. %, температура реакции – 30 °С.

Данные показывают, что степень конверсии масла увеличивается по мере роста концентрации ферментного препарата. Изменение концентрации воды в системе в диапазоне 1–3 мас. % мало сказывается

ся на степени конверсии сырья, но лучшие результаты наблюдаются при содержании воды 3 мас.% в системе. Таким образом, по результатам эксперимента оптимальная концентрация ферментного препарата составляет 30 мг/мл, количество добавленной воды – 3 %.

Культивирование микроорганизмов – продуцентов липаз проводилось глубинным методом на питательной среде следующего состава (в г/л): соевая мука – 20,0; дрожжевой экстракт – 40,0; твин-80 – 10,0; KH_2PO_4 – 0,7; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5. В качестве инокулята использовалась почвенная суспензия, разведенная в соотношении 1:10. Культивирование проводилось при температуре 30 °С и скорости вращения качалки 140 об/мин. Липазы в основном являются внеклеточными ферментами, поэтому следующими этапами выделения являлись отделение биомассы методом центрифугирования, высаливание фермента из фугата культуральной жидкости сульфатом аммония и сушка на воздухе. В результате с 250 мл культуральной жидкости было получено 0,67 г осадка, который был использован в качестве катализатора реакции переэтерификации. Для потенциального увеличения выхода продуктов реакции переэтерификации была проведена иммобилизация ферментного препарата в агаровый гель по методике, описанной в работе [5]. Также для сравнения в качестве катализаторов реакции переэтерификации использовались: культуральная жидкость, содержащая клетки живых микроорганизмов; биомасса живых клеток, полученная в результате центрифугирования культуральной жидкости; биомасса мертвых клеток, полученная путем механической дезинтеграции. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты реакции переэтерификации с использованием различных форм биокатализаторов

Биокатализатор	Количество продуктов переэтерификации, г/л	Выход переэтерификации, %
Неиммобилизованный микробный фермент	27,86	2,95
Иммобилизованный микробный фермент	76,39	7,70
Культуральная жидкость	71,37	7,23
Живые клетки	58,58	6,01
Мертвые клетки	61,29	6,27

Как видно из таблицы, иммобилизация ферментного препарата в агаровый гель приводит к увеличению активности примерно в 2,5 раза. Использование культуральной жидкости в качестве катализатора привело к схожим результатам, что можно объяснить потерей активности выделенного ферментного препарата в процессе высушивания. Использование мертвых клеток привело к более хорошим результатам, чем использование живых клеток, что может быть связано с высвобождением части внутриклеточной липазы при дезинтеграции. Наилучшие результаты получены с использованием иммобилизованного выделенного фермента и культуральной жидкости в качестве биокатализаторов, что свидетельствует о том, что основная часть активной липазы является экзоферментом и выделяется в культуральную среду. Полученные результаты по оптимизации формы биокатализатора и условий проведения переэтерификации с использованием липазных биокатализаторов могут быть использованы при организации переработки растительных масел с более активными липазными биокатализаторами.

Список литературы

1. Жеребцов Н.А., Попова Т.Н., Артюхов В.Г. Биохимия: учеб. – Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2002.
2. Получение биодизеля методом ферментативного катализа / Е.Ю. Юзбашева, П.М. Готовцев, Е.Б. Мостова, Н.И. Перковская, М.А. Ломоносова, В.В. Бутлыин, С.П. Синеокий, Р.Г. Васильев // Биотехнология. – 2014. – № 1. – С. 8–24.
3. Fjerbaek L., Christensen K.V., Norddahl B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification // Biotechnology. Bioengineering. – 2009. – Vol. 102. – P. 1298–1315.
4. Ranganathan S.V., Narasimhan S.L., Muthukumar K. An overview of enzymatic production of biodiesel // Bioresource technology. – 1999. – Vol. 99. – P. 3975–3981.
5. Иммобилизация и стабилизация ферментных препаратов липаз / В.С. Гамаюрова, М.Е. Зиновьева, Е.В. Елизарова, К.Л. Васина // Вестник Казанского технологического университета. – 2007. – С. 103–108.

Об авторах

Першин Егор Александрович – аспирант кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: egorpershin96@gmail.com.

Пирожкова Ирина Сергеевна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: ispir.2001@yandex.ru.

Пермякова Ирина Александровна – кандидат технических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: zernina88@mail.ru.

Д.Е. Петухова, О.И. Бахирева, Ю.Н. Колесова

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РЯСКИ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПРИРОДНЫХ ВОД ОТ ИОНОВ СТРОНЦИЯ

Рассмотрена возможность снижения концентрации ионов стронция в природных водах в присутствии солей жесткости с использованием метода фиторемедиации, с применением макрофитов, в частности Ряски малой. Из литературных данных известно, что данные макрофиты способны выделять карбонаты кальция на поверхность воды, что способствует накоплению стронция. Определен процент очистки воды от ионов стронция из воды с разной концентрацией стронция и кальция.

Ключевые слова: ионы стронция, макрофиты, ряска, природные воды, соли жесткости, фиторемедиация.

D.E. Petukhova, O.I. Bakhireva, Yu.N. Kolesova

STUDYING THE POSSIBILITY OF APPLICATION OF DUCKWEED FOR PURIFICATION OF NATURAL WATER FROM STRONTIUM IONS

The possibility of reducing the concentration of strontium ions in natural waters in the presence of hardness salts using the phytoremediation method, using macrophytes, in particular duckweed, is considered. It is known from the literature that these macrophytes are capable of releasing calcium carbonates to the water surface, which contributes to the accumulation of strontium. The percentage of water purification from strontium ions from water with different concentrations of strontium and calcium has been determined.

Keywords: strontium ions, macrophytes, duckweed, natural waters, hardness salts, phytoremediation.

Существует множество факторов окружающей среды, которые негативно воздействуют на здоровье человека. Пермский край является регионом, в котором хорошо развита промышленность. В Пермском крае сосредоточены химические, целлюлозно-бумажные, металлургические производства, добыча полезных ископаемых, их деятельность негативно сказывается на окружающей среде и, следовательно, на здоровье человека. Немаловажным фактором, воздействующим на здоровье человека, является качество питьевой воды. По данным Всемирной организации здраво-

охранения, примерно 25 % всех болезней обусловлены загрязнением окружающей среды и в значительной степени воды, используемой в питьевых целях [1].

Стронций играет существенную роль в организме человека. Попадая в организм человека, он способен замещать ионы кальция в составе костной ткани, так как по своим свойствам кальций близок к стронцию. При значительном накоплении стронция возникает вероятность подавления процесса кальцинирования растущих костей и остановки роста [2].

Очистка природных вод от ионов стронция в присутствии солей кальция, определяющих общую жесткость воды, – проблема, для решения которой актуальной оказалась разработка методов, в качестве одного из которых применяют фиторемедиацию. Фиторемедиация – это метод очистки сточных вод с применением зеленых растений.

Макрофиты – водные фотосинтезирующие растения, плавающие на поверхности воды или погруженные в ее толщу. Одним из самых распространенных макрофитов является ряска. Растения рода Ряска обитают по всей России, растут они в стоячих и малоподвижных водах. Ряска отличается высокой скоростью прироста биомассы, простым морфологическим строением, чувствительностью к эколого-геохимической обстановке окружающей среды [3].

Известно, что некоторые водные растения способны поглощать и накапливать ионы стронция. Филогенетическая неоднородность в поглощении различных элементов определяется минеральным составом макрофитов и отражает анатомию, морфологию и ионные транспортные системы корней и побегов. У макрофитов семейств Рдестовых, Ароидные, Роголистниковые и некоторых Водокрасовых происходит выделение карбонатов кальция на поверхности, что приводит к накоплению ими стронция [4]. Растения, накапливая соли стронция, могут долго оставаться живыми, при этом их отмершие остатки, содержащие в своем составе ионы стронция, не выделяют его обратно в воду.

Для эксперимента использовалась природная вода с повышенным по сравнению с обычной водой содержанием ионов стронция, отобранная в р. Сылве вблизи залежей селенита (CaSO_4) и целестина (SrSO_4). Анализ проб воды осуществлялся на атомно-абсорбционном спектрофотометре AAC-30. Для проведения эксперимента в природную воду в каждую колбу по отдельности добавлены соли кальция, стронция и смесь солей кальция и стронция.

На поверхность каждого из растворов помещена ряска 50–60 шт. В течение 5 дней из резервуаров осуществлялся отбор проб воды для определения концентрации ионов стронция. Результаты, полученные через 3 и 5 суток из каждой колбы, представлены в таблице.

Изменение концентрации кальция и стронция при очистке ряской

Этап	Концентрация Ca, мг/л	Концентрация Sr, мг/л
В пробе природной воды	83,63	2,114
После добавления Sr + Ca	106,2	10,107
После добавления Ca	105,9	2,063
После добавления Sr	84,05	10,11
Через 3 суток		
Sr + Ca	90,54	8,376
Ca	84,8	1,91
Sr	62,81	8,03
Через 5 суток		
Sr + Ca	86,88	4,25
Ca	82,04	1,52
Sr	61,05	4,81

Степень очистки раствора считали по формуле:

$$X = \frac{(C_{\text{исх}} - C_{\text{ис}})}{C_{\text{исх}}} 100 \%,$$

где $C_{\text{исх}}$ – исходная концентрация раствора; $C_{\text{ис}}$ – концентрация исследуемого раствора.

Степень очистки раствора, содержащего кальций и стронций, от ионов стронция составляет 58 %, а от ионов кальция – 18 %. Степень очистки раствора природной воды с добавлением стронция от ионов данного металла – 52,4 %.

По окончании эксперимента были замечены внешние изменения Ряски малой: насыщенный зеленый цвет листовой пластины приобрел светло-зеленый оттенок.

Дальнейшее проведение эксперимента приводит к частичному отмиранию ряски и образованию осадков на дне сосуда, при этом концентрация ионов стронция в растворе еще уменьшается,

что наглядно показывает возможность связывания ионов стронция и удаления их из растворов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях повышенного содержания ионов стронция в природных водах целесообразно использовать Ряску малую.

Список литературы

1. Полякова Е.В. Стронций в источниках водоснабжения Архангельской области и его влияние на организм человека // Экология человека. – 2012. – № 2.

2. Каплин В.Г., Основы экотоксикологии: учеб. пособие. – М.: КолосС, 2007. – 232 с.

3. Барановская А.Ю. Региональная специфика элементного состава водных растений сем. Рясковые (Lemnaceae) на территории Томской области // Проблемы геологии и освоения недр: труды XXIV Междунар. симп. Им. академика М.А. Усова студентов и молодых ученых, посвященного 75-летию Победы в Великой Отечественной войне, г. Томск, 6–10 апреля 2020 г.: в 2 т. – Томск: Изд-во ТПУ, 2020. – Т. 1. – С. 558.

4. Колесова Ю.Н., Бахирева О.И. Применение макрофитов для биологической очистки природных вод от ионов стронция // Химия. Экология. Урбанистика. г. Пермь, 23–24 апреля 2020 г. – Пермь: Изд-во ПНИПУ, 2020. – Т. 2.

Об авторах

Петухова Диана Евгеньевна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: di.petuhova@mail.ru.

Бахирева Ольга Ивановна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: bahirevy@mail.ru.

Колесова Юлия Николаевна – выпускница бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: yukolesowa@yandex.ru.

И.С. Пирожкова, И.А. Пермякова

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ГЛИЦЕРИНСОДЕРЖАЩЕЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*

Приведена характеристика дрожжей *Yarrowia lipolytica* как перспективного объекта биотехнологии. Рассмотрена возможность утилизации глицерина дрожжами *Yarrowia lipolytica*. Описана зависимость скорости роста дрожжей *Yarrowia lipolytica* от концентрации глицерина в питательной среде.

Ключевые слова: дрожжи *Yarrowia lipolytica*, глицерин, оптимизация, кинетика, субстратное ингибирование.

I.S. Pirozhkova, I.A. Permyakova

OPTIMIZATION OF GLYCERIN-CONTAINING MEDIUM COMPOSITION FOR CULTIVATION OF YEAST *YARROWIA LIPOLYTICA*

This article contains information about yeast *Yarrowia lipolytica* as a promising biotechnology object. We consider the possibility of recycling glycerin by yeast *Yarrowia lipolytica*. It has been found that there is a relationship between the growth rate of yeast *Yarrowia lipolytica* and the concentration of glycerin in the nutrient medium.

Keywords: yeast *Yarrowia lipolytica*, glycerin, optimization, kinetics, substrate inhibition.

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* являются одним из перспективных объектов биотехнологии. Данный вид дрожжей обладает способностью расти на средах с относительно дешевыми источниками углерода и отходами промышленного производства. К субстратам, утилизируемым *Yarrowia lipolytica*, относятся *n*-алканы, этанол, глюкоза и глицерин. В ходе своей жизнедеятельности дрожжи образуют большое количество ценных метаболитов, таких как внеклеточные белки, жирные кислоты и восковые эфиры. К преимуществам использования указанных штаммов можно отнести их устойчивость к действию множества токсичных веществ, способность расти в широком диапазоне pH, высокую активность секреции фосфатазы, протеазы и липазы и способность расти в ферментерах при глубинном культивировании [1].

В ходе работы была поставлена задача исследовать рост дрожжей *Yarrowia lipolytica* на глицерине, который является дешевым субстратом и может играть роль единственного источника углерода в среде. В настоящее время на рынке наблюдается избыток глицерина, обусловленный в том числе и увеличением объема отходов производства биодизельного топлива. В связи с этим активно разрабатываются технологии утилизации глицерина с превращением его в различные продукты с добавленной стоимостью [2]. Дрожжи *Yarrowia lipolytica* способны утилизировать глицерин, включая его в свой метаболизм фосфорилирующим путем. При этом происходит фосфорилирование глицерина глицеролкиназой и последующее дегидрирование глицерол-3-фосфата [3].

Исследования по утилизации глицерина дрожжами *Yarrowia lipolytica* немногочисленны. Не накоплен достаточный опыт работы на подобном субстрате. Важным с практической точки зрения становится описание кинетических закономерностей роста на глицерине как субстрате, что необходимо для дальнейших расчетов аппаратов по культивированию, поэтому целью данного этапа исследований стало определение оптимальной концентрации глицерина в качестве субстрата для роста культуры дрожжей *Yarrowia lipolytica*.

Для проведения исследования был получен штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* из каталога ВКМ. При посеве культуры дрожжей на агаризованную питательную среду Ридер на 4-е сутки наблюдается рост матовых непрозрачных колоний молочно-белого цвета. Колонии имеют преимущественно круглую форму, диаметр 3–5 мм, края ровные или фестончатые, у некоторых наблюдается образование складок и концентрических кругов. Колонии имеют выпуклый профиль и приподнимаются над плотной питательной средой, по консистенции – мягкие, пастообразные.

При рассмотрении под микроскопом клетки дрожжей имеют круглую, удлинненную или палочковидную форму. Клетки одиночные, могут образовывать цепочки и псевдомицелий.

Для определения оптимальной концентрации глицерина в среде в качестве единственного источника углерода было проведено культивирование дрожжей *Yarrowia lipolytica* на средах Ридер с концентрациями глицерина 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5 мас. %. Культивирование осуществляли в течение 7 дней при температуре 32 °С и постоянном перемешивании (150 об/мин).

На основании полученных экспериментальных данных был построен график зависимости удельной скорости роста дрожжей *Yarrowia lipolytica* от концентрации глицерина (рисунок).

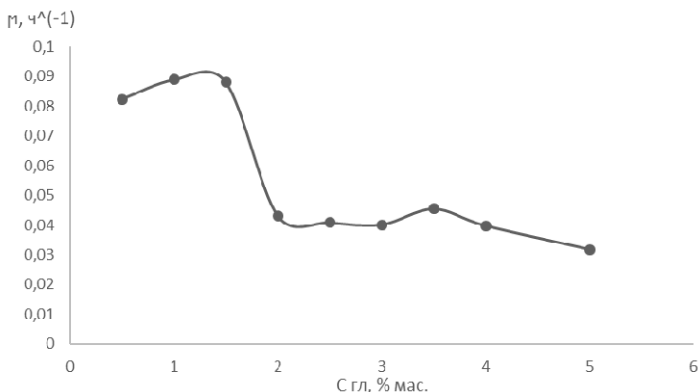


Рис. Зависимость удельной скорости роста дрожжей *Yarrowia lipolytica* $\mu, \text{ч}^{-1}$, от концентрации глицерина $C_{\text{гл}}, \text{мас.}\%$

По результатам эксперимента показано, что культура дрожжей *Yarrowia lipolytica* обладает способностью успешно утилизировать глицерин в качестве единственного источника углерода. Зависимость скорости роста дрожжей от концентрации глицерина представляет собой кривую с оптимумом. Скорость роста указанных дрожжей достигает наибольших значений при концентрациях глицерина в качестве субстрата 1 и 1,5 мас. %. При больших концентрациях глицерина наблюдается ингибирование роста культуры субстратом.

Установление зависимости скорости роста дрожжей *Yarrowia lipolytica* от концентрации глицерина в среде позволит проводить культивирование при максимальной скорости роста микроорганизмов, что в дальнейшем даст возможность рекомендовать оптимальные режимы работы реактора для культивирования.

Список литературы

1. С1-Штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica* – продуцент лимонной кислоты и способ получения лимонной кислоты: пат. RU 2 096 461. Финогенова Т.В., Шишканова Н.В., Странео Паоло, Мо-

ретти Энрико. Патентообладатели: Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (RU), Акционерное общество «Прессиндустрия С.п.А.» (IT). – № 93039858/13; заявл. 04.08.1993; опубл. 20.11.1997.

2. Biodiesel's trash is a biorefineries' treasure: the use of "dirty" glycerol as an industrial fermentation substrate / A.J. Crosse, D. Brady, N. Zhou, K. Rumbold // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2019. – Vol. 36(1).

3. Моргунов И.Г. Пути биосинтеза кетокислот из глицерина у дрожжей *Yarrowia (Candida) lipolytica*: автореферат дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04. – Пушино, 1994. – 22 с.

4. Ассимиляция триглицеридов и продуктов их гидролиза у дрожжей *Yarrowia lipolytica* / С.В. Камзолова, И.Г. Моргунов, Т.Н. Козырева, Т.В. Финогенова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2007. – Т. 3, № 2 – С. 5–12.

Об авторах

Пирожкова Ирина Сергеевна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: ispir.2001@yandex.ru.

Пермякова Ирина Александровна – кандидат технических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: permyakova-i88@yandex.ru.

В.И. Сагидуллина, А.В. Ахова, А.Г. Ткаченко

ПОИСК БАКТЕРИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ 1,5-ДИАМИНОПЕНТАНА

Изучена способность природных изолятов *Escherichia coli* продуцировать полиамины в разных условиях культивирования. Отобраны изоляты, обладающие более высокой способностью синтезировать 1,5-диаминопентан по сравнению с лабораторным штаммом K12. Наиболее высокая концентрация 1,5-диаминопентана, накопленная в среде в процессе культивирования в исследованных условиях, составила 680 мкМ.

Ключевые слова: 1,5-диаминопентан, кадаверин, декарбоксилаза, лизин.

V.I. Sagidullina, A.V. Akhova, A.G. Tkachenko

SEARCH FOR BACTERIA PRODUCING 1,5-DIAMINOPENTANE

The ability of natural isolates of *Escherichia coli* to produce polyamines under different cultivation conditions was studied. Natural isolates with a higher ability to synthesize 1,5-diaminopentane compared to the laboratory strain K12 were selected. The highest concentration of 1,5-diaminopentane accumulated in the medium during cultivation under the studied conditions was 680 μ M.

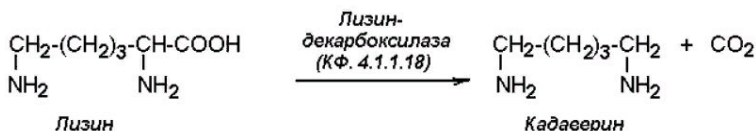
Keywords: 1,5-diaminopentane, cadaverine, decarboxylase, lysine.

Полиамины – это алифатические полиоснования, содержащие в своем составе различное количество аминогрупп (в основном от 2 до 4) [1]. Полиамины имеют важное практическое значение для человека, так как они могут быть использованы в качестве одного из мономеров в процессе синтеза полиамидов. Полиамиды на основе полиамина 1,5-диаминопентана (РА 5Х) имеют широкие перспективы применения в машиностроении, производстве промышленных деталей, в текстильной промышленности и других отраслях, благодаря таким характеристикам, как высокая прочность, ударная вязкость, высокая температура плавления и устойчивость к органическим растворителям [2]. В промышленном масштабе производство полиаминов осуществляют путем химического синтеза из невозобновляемых нефтехимических продуктов с использованием дорогостоящих каталитических систем и реагентов, являющихся высокотоксичными и легко воспламеняющимися [3]. Такая технология экологически и экономически нецелесообразна, что наталкивает на поиск альтернативных

возможностей. Одним из таких вариантов является биотехнологический способ производства полиаминов из возобновляемого сырья, основанный на использовании цельных клеток или выделенных ферментов. Бактерии могут применяться в качестве целноклеточных биокатализаторов синтеза 1,5-диаминопентана или служить источником высокоактивных лизиндекарбоксилаз.

Полиамины присутствуют у всех форм живых организмов и участвуют в разнообразных биологических процессах, таких как синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты, рибонуклеиновой кислоты и белка, и, кроме того, в клеточном делении [1, 4]. Также полиамины способствуют борьбе бактериальных клеток с различными видами стресса, в том числе с воздействием активных форм кислорода (АФК), ультрафиолета (УФ) и нагревания [4]. У *Escherichia coli* полиамины представлены кадаверином (1,5-диаминопентан), путресцином (1,4-диаминобутан) и спермидином (*N*-(3-аминопропил)-1,4-диаминобутан) [1].

Кадаверин образуется путем прямого декарбоксилирования *L*-лизина при участии фермента – лизиндекарбоксилазы [2].



В синтезе кадаверина участвуют два типа лизиндекарбоксилаз: конститутивная LdcC и индуцибельная CadA. Максимальная активность LdcC отмечается при pH около 7,5, а активность CadA проявляется при pH, равном 5,5 [2].

Цель данного исследования – анализ способности природных изолятов *E. coli* продуцировать 1,5-диаминопентан.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования были выбраны 60 природных изолятов *E. coli*, выделенных из разных источников, и штамм *E. coli* K12, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов.

Бактериальные клетки, сохраняемые в полужидком агаре, переносили в пробирки с ватно-марлевыми пробками, содержащие 3 мл Luria-Bertani бульона. Культивирование проводили при $T = 37^\circ\text{C}$,

pH = 7,5 и 120 об/мин на качалке GFL-1092 (Германия) в течение 20 ч. Для культивирования природных изолятов в микроаэрофильных условиях бактериальные клетки были посеяны с полужидкого агара в пробирки с ватно-марлевыми пробками в 3 мл LB-бульона с добавлением 100 мМ MES (pH = 5,5). Культивировали около 20 ч при $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в термостате без перемешивания.

Поскольку *E. coli* способна как накапливать полиамины внутри клетки, так и выделять в среду, для получения клеточных и средовых полиаминов в микропробирки с коническим дном объемом 2 мл вносили 500 мкл культуры и центрифугировали 5 мин при 16 000g на микроцентрифуге 5415D Eppendorf (Германия). Для выделения средовых полиаминов 200 мкл надосадка, образующегося в результате центрифугирования, переносили в круглодонные микропробирки объемом 2 мл и добавляли 20 мкл 4Н хлорной кислоты. К осадку в микропробирках с коническим дном объемом 2 мл, полученному в процессе центрифугирования, добавляли 200 мкл 0,4Н хлорной кислоты. Следом встряхивали в течение 1 ч до полного растворения осадка. Таким способом получали клеточные полиамины.

Для определения концентрации образующихся в реакционной смеси полиаминов проводили их дериватизацию дансилхлоридом [5]. В микропробирках объемом 2 мл смешивали раствор пробы, дансил хлорида и карбоната натрия в соотношении 1:2:1. Инкубировали реакционную смесь 2 ч в термостате при $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. По окончании реакции смесь выпаривали и экстрагировали бензолом. Далее проводили тонкослойную хроматографию дансил-полиаминов. Высушенные хроматограммы фотографировали в ультрафиолетовом свете, возбуждающем свечение пятен дансил-полиаминов синезеленого цвета, величина и яркость которых пропорциональны их концентрации. Количественный анализ полиаминов проводили методом внешнего стандарта.

Результаты и их обсуждение

Задачей исследования явилось определение способности продуцировать кадаверин природными изолятами с последующим отбором продуцентов, синтезирующих большое количество 1,5-диаминопентана.

Семнадцать природных изолятов *E. coli* продуцировали больше клеточного кадаверина, чем лабораторный штамм K12 при

pH = 7,5. Четыре природных изолята *E. coli* (под номерами 35, 48, 55, 62) накапливали больше клеточного кадаверина, чем лабораторный штамм K12 при культивировании в кислой среде (pH = 5,5). Наибольшее количество кадаверина при данных условиях накапливалось в клетках изолята под номером 35. Сверхпродуцентом клеточного кадаверина, вне зависимости от условий культивирования, явился природный изолят под номером 48. Тридцать семь природных изолятов *E. coli* выделяли в среду большее количество кадаверина, чем лабораторный штамм K12 в условиях культивирования при pH = 7,5. Наибольшее количество кадаверина при данных условиях выделял в среду изолят под номером 48, что составило 518 мкМ. Сорок два природных изолята *E. coli* выделяли в среду большее количество кадаверина, чем лабораторный штамм K12 при культивировании в кислой среде (pH = 5,5). Наибольшее количество кадаверина при данных условиях выделял в среду изолят под номером 55. Четырнадцать природных изолятов из 60 больше накапливали кадаверин в клетке, чем выделяли в среду в условиях культивирования в нейтральной среде (pH = 7,5). Сорок семь природных изолятов выделяли большее количество кадаверина в среду, нежели накапливали в клетке при культивировании в среде с pH = 5,5. Лабораторный штамм K12 и природный изолят под номером 62 больше накапливали кадаверина в клетке, чем выделяли в среду, вне зависимости от условий культивирования. Самая высокая концентрация кадаверина накапливалась в клетках природного изолята под номером 35 при культивировании в кислой среде, она составила 991 нмоль/мг абсолютно сухой биомассы. Самая высокая концентрация кадаверина, выделенного в среду, обнаружена при культивировании природного изолята под номером 55 при pH = 5,5, она составила 680 мкМ.

Заключение

В результате исследования способности природных изолятов *E. coli* продуцировать кадаверин (1,5-диаминопентан) при разных условиях культивирования удалось выделить микроорганизмы, которые могут быть использованы для разработки цельноклеточных биокатализаторов, а также являться потенциальными источниками высокоактивных лизиндекарбоксилаз.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы АААА-А19-119112290009-1.

Список литературы

1. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms // Microbiological Reviews. – 1985. – Vol. 49. – P. 81–99.
2. Advances in cadaverine bacterial production and its applications / W. Ma, K. Chen, Y. Li, N. Hao, X. Wang, P. Ouyang // Engineering. – 2017. – Vol. 3. – P. 308–317.
3. Bio-based production of monomers and polymers by metabolically engineered microorganism / H. Chung, J.E. Yang, J.Y. Ha, T.U. Chae, J.H. Shin, M. Gustavsson, S.Y. Lee // Current Opinion in Biotechnology. – 2015. – Vol. 36. – P. 73–84.
4. Rhee H.J., Kim E-J., Lee J.K. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules // J. Cell. Mol. Med. – 2007. – Vol. 11, no. 4. – P. 685–703.
5. Чудинов А.А., Чудинова Л.А., Коробов В.П. Метод определения низкомолекулярных олигоаминов в различном биологическом материале // Вопросы медицинской химии. – 1984. – № 4. – С. 127–132.

Об авторах

Сагидуллина Вероника Илнуровна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: veronikabarda@mail.ru.

Ахова Анна Викторовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: akhovan@mail.ru.

Ткаченко Александр Георгиевич – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, e-mail: agtkachenko@iegm.ru.

С.Н. Усанина, А.Ю. Максимов

СЕЛЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ПРОТЕАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, ИЗ ПРИРОДНЫХ ЗАКИСЛЕННЫХ СРЕД

В результате селекционной работы из закисленных техногенных сред выделены ацидотолерантные культуры актинобактерий и стрептомицетов, обладающие выраженной внеклеточной протеазной активностью, перспективные для биотехнологии.

Ключевые слова: актинобактерии, ацидотолерантность, казеин, кислые протеазы, протеазная активность, стрептомицеты, шахтные воды.

S.N. Usanina, A.Yu. Maksimov

SELECTION OF BACTERIA WITH PROTEASE ACTIVITY FROM NATURAL ACIDIFIED MEDIA

As a result of selection, acid tolerant cultures of actinobacteria and streptomycetes were isolated from acidified technogenic media, which have pronounced extracellular protease activity and are promising for biotechnology.

Keywords: actinobacteria, acid tolerance, casein, acid protease, protease activity, streptomycetes, mine waters.

В условиях умеренно закисленных и экстремально низких значений pH развиваются ацидотолерантные и ацидоофильные бактерии. Такие среды достаточно широко распространены в природе и само закисление, как правило, является следствием происходящих в них микробиологических процессов. Так, известен феномен кислых шахтных вод, связанный с тем, что в результате масштабной деятельности горнодобывающей промышленности в местах выработок, шахтах создаются благоприятные условия для развития ацидофильных железоокисляющих хемоавтотрофных бактерий, закисляющих водную среду. Аналогичные процессы наблюдаются и на поверхности и усиливаются в условиях засоления (рис. 1).

Подобные объекты занимают значительные территории в Пермском крае: Кизеловский угольный бассейн, выработки калийных и магниевых солей в Березниковско-Соликамском регионе [2, 3]. Данные среды обычно бедны органикой и содержат относительно низкую

численность микроорганизмов, значительная часть которых для культивирования в лабораторных условиях нуждается в специфических средах и условиях или являются «некультивируемыми». Однако вследствие того, что это открытые системы, в них попадают и развиваются и гетеротрофные ацидотолерантные формы. С другой стороны, широко распространены и среды, обогащенные органикой и закисляемые за счет биогенных процессов брожения.



Рис. 1. Поверхностное отложение оксидов и гидроксидов железа в результате биогеохимической деятельности

Среди разнообразия микрофлоры закисленных сред представляют интерес продуценты гидролитических ферментов, используемых для внеклеточного первичного метаболизма биополимеров и липидов. Данные ферменты обычно либо выделяются во внешнюю среду, либо остаются в частично связанном виде, ассоциированными с клеточной стенкой или экзополисахаридами, составляющими внеклеточный матрикс. У грамотрицательных бактерий такие ферменты также содержатся в периплазматическом пространстве. Среди таких ферментов важную роль занимают протеазы, необходимые для утилизации бактериями биогенных субстратов [1].

Производство ферментов играет важную роль в биотехнологии и относится к отраслям, объем продукции которых постоянно растет. В частности, протеазы наиболее широко применяются в производстве моющих средств, а также важны для пищевой (переработка мяса, молочных продуктов, сыроделие и др.), кожевенной промышленности, в иной переработке биогенного сырья, медицине. При обилии коммерческих препаратов щелочных и нейтральных протеаз выбор кислых протеолитических ферментов невелик.

Целью данной работы является изучение внеклеточной протеолитической активности ацидотолерантных культур, выделенных из образцов сред с признаками микробиологического закисления из шахтных вод г. Губахи и изливов в долине, примыкающей к промышленной зоне ОАО «Уралкалий».

На данных техногенных объектах были отобраны, охарактеризованы химически и использованы для выделения бактерий следующие образцы:

1. СКВ Калинина – излив из штольни шахты им. Калинина, pH 2,7.

2. ДО – донные отложения шахтных вод г. Губахи (рис. 2, *а*), pH суспензии 2,9.

3. Дол – поверхностный излив в долине, примыкающей к промышленной зоне ОАО «Уралкалий» (рис. 2, *б*), pH = 5,6.



Рис. 2. Техногенные среды, закисленные в результате биогеохимических процессов (деятельности железобактерий): *а* – выход шахтных кислых вод в районе г. Губахи; *б* – поверхностное закисление почвы в районе г. Березники

Проведены высевы гетеротрофных микроорганизмов, устойчивых к подкисленной среде, ранее полученных из вышеописанных образцов накопительных культур.

Для получения гетеротрофных микроорганизмов проводили посев микробиологической петлей на среду LB, закисленную уксусом до pH = 4,5, и на среду Сабура (селективная среда для выращивания гетеротрофных ацидотолерантных культур бактерий и грибов).

В результате серии пересевов и чистки культур на подкисленной полноценной среде, содержащей казеин, выделены три культуры гетеротрофных бактерий, стабильно растущие на богатых средах с рН 4–5.

Исследована способность данных культур к гидролизу казеина. Для этого культуры высевали на агаризованную среду N, содержащую 0,5 % казеина. Установлено, что все исследованные культуры способны к утилизации казеина. Зоны гидролиза казеина вокруг колоний составляли:

- СКВ Калинина – 5 мм;
- донные отложения шахтных вод г. Губахи – 2–5 мм;
- из образца «Дол» – 30 мм.

Таким образом, выделены бактерии, обладающие протеолитической активностью. Очевидно, что культура, проявившая зону разложения казеина с максимальным диаметром, секретирует фермент во внешнюю среду, следствием чего является его миграция и относительно высокая подвижность. Другие культуры, вероятно, обладают ферментом, частично связанным с внеклеточным полимерным матриксом.

В результате предварительной характеристики установлено, что культура бактерий, выделенная из образца СКВ, обладает коккообразной формой клеток, грамположительна, по совокупности культурально-морфологических и хемотаксономических признаков относится к актинобактериям. Изолят из образца ДО представляет собой актинобактерии палочковидной формы. Изолят из образца «Дол» является мицелиальной спорообразующей культурой, относится к актиномицетам рода *Streptomyces*. Точная идентификация активных изолятов будет проведена с помощью секвенирования генов 16S рРНК.

Таким образом, в результате проведенной селекционной работы из закисленных техногенных сред выделены культуры актинобактерий и стрептомицетов, обладающие выраженной внеклеточной протеазной активностью, перспективные для биотехнологии.

Работа выполнена в рамках Государственного задания, номер госрегистрации АААА-А19-119112290008-4

Список литературы

1. Влияние содержания металлов на состав микробных сообществ кислых дренажных вод месторождения полиметалличе-

ских руд / В.В. Кадников, Д.А. Ивасенко, А.В. Белецкий, А.В. Марданов, Э.В. Данилова, Н.В. Пименов, О.В. Карначук, Н.В. Равин // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 6. – С. 732–739.

2. Максимович Н.Г., Черемных Н.В., Хайрулина Е.А. Экологические последствия ликвидации Кизеловского угольного бассейна // Географический вестник. – 2006. – № 2 (4). – С. 128–134.

3. Khayrulina E., Maksimovich N. Influence of drainage with high levels of water-soluble salts on the environment in the Verhnekamskoe potash deposit, Russia // Mine Water Environment. – 2018. – Т. 37, no. 3. – С. 595–603.

Об авторах

Усанина Софья Николаевна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: usanina.sofya@yandex.ru.

Максимов Александр Юрьевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, e-mail: almaks1@mail.ru.

А.С. Филипенко, Ю.М. Стасюк, С.Б. Чачина

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДООЧИСТКА СТОЧНЫХ ВОД. ИССЛЕДОВАНИЕ СТОЧНЫХ ВОД НА ХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Для эксперимента в качестве объекта исследования взяты пробы бытовых сточных вод, поступающих на очистные сооружения канализации ОСК ОАО «ОмскВодоканал». Проведены исследования степени очистки сточных вод методом химических показателей, проведена доочистка сточных вод, определена степень эффективности доочистки сточных вод водными растениями. В результате аналитической оценки выявлен наиболее эффективный метод доочистки.

Ключевые слова: сточные воды, биологическая очистка, методы очистки.

A.S. Filipenko, Yu.M. Stasyuk, S.B. Chachina

BIOLOGICAL POST-TREATMENT OF WASTEWATER. STUDY OF WASTEWATER FOR CHEMICAL INDICATORS

To conduct the experiment, samples of domestic wastewater entering the treatment facilities of the USC of JSC "OmskVodokanal" were taken as the object of research. The level of wastewater treatment according to the chemical parameters of tertiary wastewater treatment, a certain degree of efficiency of wastewater treatment of enterprises is investigated. As a result of the analytical evaluation, the most effective method of post-traumatic treatment was identified.

Keywords: waste water, biological treatment, treatment methods.

На сегодняшний день, в связи с повсеместным распространением и образованием сточных вод, проблемы загрязнения окружающей среды являются чрезвычайно актуальными. И проблема не ограничивается большим количеством бытовых сточных вод, что неизбежно в небольших городах, особенно в мегаполисах. Сточные воды на заводах и фабриках гораздо опаснее, поэтому очистка сточных вод на промышленных предприятиях – это глобальная задача, требующая решения.

Промышленные сточные воды при поступлении в систему водоснабжения или при сбросе в водные объекты должны быть подвергнуты очистке механическими, химическими, физико-химическими, биологическими и термическими методами до необходимого качества [1].

Что касается загрязнений биологического происхождения (бактерии и другие микроорганизмы), то раньше для их нейтрализации активно использовался хлор, а сейчас все больше применяется более совершенная технология ультрафиолетового излучения [2].

В качестве объектов исследования нами были выбраны: природный цеолит, древесный уголь, макрофиты (водные растения) роголистник, валлиснерия, ряска, ломариопсис.

Роголистник погруженный, темно-зеленый (*Ceratophyllum demersum*), представляет собой стебель, покрытый листочками в виде мягких нитей, имеющих светло-зеленую окраску. Каждый стебель разделен на 6–8 долей, длина которых может достигать 7 см.

Гигантская валлиснерия (*Vallisneria gigantea*). В высоту данное растение может достигать 1 м, а ширина листов достигает 4 см. Листья темно-зеленого цвета вырастают в виде пучков.

Ряска – многолетнее растение, относящееся к семейству ароидных. Представляет собой крошечный плавающий вид, стоит отметить, что это одна из самых маленьких водорослей в мире.

Ломариопсис, научное наименование *Lomariopsis cf. Lineata*. *Lomariopsis cf. Lineata* представляет собой широкие круглые «лепестки» без надразов в верхней части, расположенные один за другим. Очень тонкие, прозрачные, темно-зеленые цвета, гибкие. При слабом освещении «лепестки» удлиняются [3].

Нами было проведено исследование степени очистки бытовых сточных вод, поступающих на очистные сооружения канализации (ОСК) ОАО «ОмскВодоканал», и определена эффективность методов, применяемых на ОСК, а также разработанных нами методов доочистки (фильтрации).

Было взято четыре пробы сточных вод с ОСК ОАО «ОмскВодоканал»: вход в канализацию, выход с первичных отстойников (перед биологической очисткой), выход со вторичных отстойников, выход (чистая вода).

Для сравнения вышепредставленных методов очистки сточных вод, мы выбрали следующие методы доочистки (фильтрации): фильтрация цеолитом, фильтрация активированным углем, доочистка роголистником, доочистка валлиснерией, доочистка ряской, доочистка *Lomariopsis*.

Для определения лучшего по эффективности метода очистки воды мы сравнили выходящую (проба № 4) с очистных сооружений канализации ОАО «ОмскВодоканал» воду с предложенными

нами методами: фильтрации цеолитом (проба № 5), фильтрации активированным углем (проба № 6) и доочистки водными растениями роголистником (проба № 7), валлиснерией (проба № 8), ряской (проба № 9) и *Lomariopsis* (проба № 10) (таблица).

Результаты исследований химических показателей сточных вод

Номер пробы воды	Щелоч- ность, мг-экв/л	Кислот- ность, мг-экв/л	Жест- кость общая, мг-экв/л	Окисляе- мость, мг-экв/л	Са, мг- экв/л	Азотосодержа- щие соедине- ния, мг/л NO ₂
1. Вход в канализацию	9,6	4,8	4,85	21,25	2,0	0,14
2. Выход с первичных отстойников	8,4	4,2	4,6	17,12	2,0	0,0721
3. Выход со вторичных отстойников	8,0	4,0	4,35	14,1	1,8	0,048
4. Выход	3,6	1,6	3,55	8,02	1,41	0,011
5. Фильтрация цеолитом	2,2	1,4	5,2	7,31	1,32	0,0074
6. Фильтрация активированным углем	1,6	1,2	5,35	7,02	1,28	0,0053
7. Доочистка роголистником	1,4	1,0	0,72	5,97	1,07	0,0022
8. Доочистка валлиснерией	1,4	1,2	1,02	6,58	1,12	0,003
9. Доочистка ряской	1,5	1,3	0,86	6,32	1,10	0,0029
10. Доочистка <i>Lomariopsis</i>	1,4	1,2	1,01	6,59	1,15	0,0031

Кислотность. Наибольшая эффективность снижения кислотности сточных вод после фильтрации через цеолит составила 70,8 %, доочистки роголистником – 79,2 %.

Щелочность. Эффективность снижения щелочности сточных вод, после фильтрации цеолитом составила – 77 %, после фильтрации углем – 84 %, после доочистки роголистником – 85,4 %, после доочистки валлиснерией – 85,4 %, после доочистки ряской – 84,4 %, а после доочистки *Lomariopsis* – 85,4 %.

Окисляемость. Эффективность снижения показателей окисляемости, после фильтрации цеолитом составила 65,6 %, после фильтрации углем – 67 %, после доочистки водным растением роголистник – 72 %, после доочистки водным растением валлиснерия – 69 %, после доочистки водным растением ряской – 70,2 %, а после доочистки водным растением *Lomariopsis* – 68,9 %.

Общая жесткость. Эффективность снижения показателей общей жесткости, после доочистки роголистником составила 85,2 %, после доочистки валлиснерией – 79 %.

Кальций. Эффективность снижения содержания кальция в пробах воды, после фильтрации цеолитом составила 34 %, после доочистки роголистником – 46,5 %.

Нитриты. Эффективность сточной воды от нитритов после фильтрации цеолитом составила 94,7 %, после фильтрации углем – 96,2 %, после доочистки водным растением роголистник – 99,84 %, а после доочистки водным растением валлиснерия – 99,8 %, после доочистки ряской – 97,3 %, после доочистки *Lomariopsis* – 97,7 %.

Список литературы

1. Истомин И.Б., Билло Е.В., Сухаревская Е.С. Очистка сточных вод // СОВРЕМЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ – 2018: материалы Междунар. науч.-практ. конф. / под общ. ред. А.И. Вострецова. – М.: Мир науки, 2018. – С. 134–138.

2. Круглова М.И., Анисина О.В. Биологическая очистка сточных вод // АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 90-летию со дня рождения проф. В.А. Киршина / Федер. центр токсикол., радиац. и биол. безопасности. – Казань, 2018. – С. 148–151.

3. Загитов Э.С. Биологические методы очистки сточных вод // СОВРЕМЕННЫЕ НАУЧНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ: Актуальные вопросы, достижения и инновации XIII Международной науч.-практ. конф. – Пенза, 15 августа 2020 г. – Пенза, 2020. – С. 17–19.

Об авторах

Филипенко Алина Сергеевна – студентка, Омский государственный технический университет, e-mail: lika30699@mail.ru.

Стасюк Юлия Михайловна – студентка, Омский государственный технический университет, e-mail: juliastasyuk@yandex.ru.

Чачина Светлана Борисовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры «Биотехнология, технология общественного питания и товароведение», Омский государственный технический университет, e-mail: ksb3@yandex.ru.

Р.А. Хасанова, А.В. Ахова, А.Г. Ткаченко

ПОИСК БАКТЕРИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ 1,4-ДИАМИНОБУТАНА

Исследовано 60 природных изолятов *Escherichia coli* на способность продуцировать 1,4-диаминобутан (путресцин) в разных условиях культивирования. Максимальная концентрация внутриклеточного 1,4-диаминобутана составила 192 нмоль/мг сухой биомассы, а наибольшая концентрация путресцина, выделенного в среду, равнялась 207 мкМ, что было соответственно в 5 и 16 раз выше по сравнению с лабораторным штаммом K12. Природные изоляты также продуцировали спермидин, для биосинтеза которого 1,4-диаминобутан является субстратом. Максимальная концентрация спермидина в клетке составила 40 нмоль/мг сухого веса, в среде спермидин не обнаруживался.

Ключевые слова: полиамины, 1,4-диаминобутан, путресцин, декарбоксилаза, биопластик.

R.A. Khasanova, A.V. Akhova, A.G. Tkachenko

THE SEARCH FOR BACTERIAL PRODUCERS OF 1,4-DIAMINO BUTANE

60 *Escherichia coli* natural isolates were examined for the ability to produce 1,4-diaminobutane (putrescine) under various cultivation conditions. The maximum concentration of intracellular 1,4-diaminobutane was 192 nmol/mg dry weight, that was 5-fold higher than that of the laboratory K12 strain. The highest concentration of putrescine released into the medium was 207 μ M, which was 16 times higher than those of K12 culture. Natural isolates also produced spermidine, a substrate for the biosynthesis of 1,4-diaminobutane. The highest concentration of spermidine in the cell was 40 nmol/mg dry weight. There was no spermidine in the medium.

Keywords: polyamines, 1,4-diaminobutane, putrescine, decarboxylase, bioplastic.

На сегодняшний день большое практическое применение имеют пластмассы, в частности полиамиды. Полиамиды могут быть синтезированы из полиаминов, например для синтеза нейлона-4,6 используют 1,4-диаминобутан. Полиамины получают химическим синтезом, но данный процесс является энергозатратным и для осуществления его используются невозобновляемые ресурсы, а также высокотоксичные и легковоспламеняющиеся вещества, что может оказывать отрицательное влияние на окружающую среду и,

в частности, на здоровье человека [1]. Альтернативой химическому синтезу 1,4-диаминобутана может стать биотехнологический способ его получения из возобновляемых ресурсов, который значительно сократит негативное влияние на окружающую среду [4].

1,4-Диаминобутан (путресцин) обнаруживается в клетках всех живых организмов. Он образуется путем декарбоксилирования орнитина при участии фермента орнитиндекарбоксилазы или декарбоксилирования аргинина с образованием агматина с помощью аргининдекарбоксилазы, который затем гидролизруется агматинуреагидролазой до мочевины и путресцина. В основном в клетках бактерий преобладает орнитиновый путь [2]. Путресцин является предшественником спермидина, который образуется путем добавления пропиламиновой группы, источником которой является S-аденозилметилтиопропиламин. Реакция катализируется ферментом спермидинсинтазой. У *E. coli* встречаются два типа декарбоксилаз: биodeградативная, оптимум pH среды для которой находится в области низких значений, и биосинтетическая, которая более активна при нейтральных значениях pH [3].

Цель данной работы – исследовать природные изоляты *Escherichia coli* на способность продуцировать 1,4-диаминобутан.

Материалы и методы исследования

Шестьдесят природных изолятов *E. coli* и штамм *E. coli* K12, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов, культивировали в 3 мл LB-бульона при pH = 7,5 в пробирках с ватно-марлевыми пробками около 20 ч при $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 120 об/мин на качалке GFL-1092 (Германия), а также проводили культивирование данных изолятов *E. coli* в условиях пониженной аэрации в 3 мл LB-бульона с добавлением 100 мМ MES (pH = 5,5), что позволило добиться длительного сохранения pH среды культивирования, равного 5,5. По истечении времени культивирования в данных культурах определяли количество полиаминов, выделенных в среду и накопленных в бактериальных клетках. Помимо концентрации целевого полиамина определяли количество спермидина, на биосинтез которого может расходоваться путресцин.

Для экстракции полиаминов из бактериальных клеток и получения средовых проб отбирали 500 мкл 20-часовой культуры в микропробирки объемом 2 мл и центрифугировали в течение 5 мин при

16000g. После этого отбирали 200 мкл надосадка, переносили в микропробирки объемом 2 мл и добавляли 20 мкл 4Н хлорной кислоты. Для получения клеточных проб к осадку добавляли 200 мкл 0,4Н хлорной кислоты. Далее встряхивали в течение 60 мин.

Для определения концентрации полиаминов производили их дериватизацию дансилхлоридом. Для этого в микропробирках объемом 2 мл смешивали раствор пробы, дансилхлорида и карбоната натрия и инкубировали данную реакционную смесь в течение 2 ч в термостате при $T = 37^{\circ}\text{C}$. По окончании реакции смесь выпаривали и экстрагировали бензолом для проведения тонкослойной хроматографии. Высушенные хроматограммы с дансил-полиаминами фотографировали в ультрафиолетовом свете. С помощью программы Adobe Photoshop CC 2015.5 (пробная версия) определяли величину и яркость пятен дансил-полиаминов, которые пропорциональны их концентрации. Количество полиаминов в клетке рассчитывали с учетом значений абсолютно сухой биомассы (АСБ).

Данные, полученные в трех отдельных экспериментах, представлены в формате среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD).

Результаты и выводы

Анализируя полученные данные, можно отметить, что при $\text{pH} = 7,5$ 26 природных изолятов накапливали больше путресцина в клетках по сравнению с *E. coli* K12. Самая высокая концентрация путресцина в клетке наблюдалась у природного изолята № 32, которая составила $(114,55 \pm 21,11)$ нмоль/мг АСБ. При культивировании бактерий при $\text{pH} = 5,5$ в условиях микроаэрации 31 природный изолят накапливал больше путресцина в клетках, чем *E. coli* K12. Самая высокая концентрация путресцина в клетке составила $(192,01 \pm 29,48)$ нмоль/мг АСБ у изолята № 34.

В условиях, способствующих активации биосинтетических форм фермента ($\text{pH} = 7,5$), 51 природный изолят выделял больше путресцина в среду по сравнению с *E. coli* K12. Наибольшая концентрация путресцина, выделенного в среду, равнялась $(206,96 \pm 124,49)$ мкМ у изолята № 24.

Сорок семь природных изолятов выделяли в среду больше путресцина, чем *E. coli* K12, при культивировании на средах с $\text{pH} = 5,5$. Наибольшая концентрация путресцина, выделенного в среду, выявлена у изолята № 24, которая составила $(205,33 \pm 32,16)$ мкМ.

Путресцина в клетках накапливалось и выделялось в среду в 1,6–1,8 раз больше при pH = 5,5, чем при pH = 7,5, это можно связать с тем, что большинство исследованных природных изолятов *E. coli* содержали биodeградативные формы декарбоксилаз.

Три природных изолята накапливали высокие концентрации путресцина в клетке, но мало выделяли в среду. Пять природных изолятов, наоборот, выделяли большое количество путресцина в среду, но мало накапливали в клетке. Это связано с разной способностью микроорганизмов накапливать полиамины в клетках без ингибирования биохимических процессов.

При культивировании бактерий на средах с pH = 7,5 4 природных изолята накапливали больше спермидина в клетках по сравнению с *E. coli* K12. Самая высокая концентрация спермидина в клетке была равна $(30,24 \pm 18,62)$ нмоль/мг АСБ и наблюдалась у природного изолята № 4. При pH = 5,5 40 природных изолятов накапливали больше спермидина в клетках, чем *E. coli* K12. Самая высокая концентрация спермидина была обнаружена в клетках изолята № 30 и равнялась $(39,89 \pm 47,03)$ нмоль/мг АСБ.

Спермидина в клетках накапливалось больше в 4 раза при pH = 5,5, чем при pH = 7,5. В среде спермидина обнаружено не было.

Заключение

По результатам экспериментов по исследованию способности природных изолятов *E. coli* продуцировать путресцин (1,4-диаминобутан) и спермидин (3-аминопропил-1,4-диаминобутан) были найдены природные изоляты *E. coli* с потенциально высокой активностью аргинин- или орнитиндекарбоксилазы, которые могут быть использованы для разработки биотехнологического способа получения путресцина.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы АААА-А19-119112290009-1.

Список литературы

1. Chung H., Eun Yang J., Yeon Ha J. Bio-based production of monomers and polymers by metabolically engineered microorganism // Current Opinion in Biotechnology. – 2015. – Vol. 36. – P. 73–84.

2. Morris D.R., Koifron K.L. Putrescine biosynthesis in *Escherichia coli*. Regulation through pathway selection // J. Biol. Chem. – 1969. – Vol. 244, no. 22. – P. 6094–6099.

3. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms // Microbiological Reviews. – 1985. – Vol. 49. – P. 81–99.

4. Qian Z.X., Xia X.X., Lee S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of putrescine: a four carbon diamine // Biotechnology and Bioengineering. – 2009. – Vol. 104, no. 4. – P. 651–662.

Об авторах

Хасанова Русана Аликовна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: Rusanochik@yandex.ru.

Ахова Анна Викторовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: akhovan@mail.ru.

Ткаченко Александр Георгиевич – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, e-mail: agtkachenko@iegm.ru.

Е.А. Цыпкина, Л.С. Пан

ПОЛУЧЕНИЕ БИОСОРБЕНТОВ ДЛЯ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ ВОДЫ НА ОСНОВЕ МОРСКИХ ВОДОРОСЛЕЙ И ЙОДА

В настоящее время необходимость получения очищенной воды остается мировой проблемой, поэтому разработка новых методов и материалов, в том числе и сорбентов, является актуальной. В связи с этим одним из перспективных методов обеззараживания является синтез новых биосорбентов, которые должны иметь высокие характеристики: эффективность очистки, простота процесса, экологичность, длительный срок службы. В качестве носителей для получения сорбентов были выбраны 3 вида морских водорослей, отличающихся по составу и структуре. Благодаря своему уникальному строению водоросли обладают способностью к клатратообразованию.

Получены сорбенты на основе морских водорослей видов *Cystoseira barbata*, *Zostera marina*, *Phyllophora nervosa* и дезинфицирующих агентов: йода и йодиола. Показано, что полученные биосорбенты обладают высокой обеззараживающей способностью, которая зависит как от структуры и строения водорослей, так и от состава и строения дезинфицирующего агента.

Ключевые слова: морские водоросли, йод, поливиниловый спирт, образование клатратов, биосорбенты, обеззараживание воды, обеззараживающая способность.

Е.А. Tsyapkina, L.S. Pan

OBTAINING BIOSORBENTS FOR DISINFECTION WATERS BASED ON SEA ALGAE AND IODINE

Currently the need for purified water remains a global problem. Therefore, the development of new methods and materials, including sorbents, is relevant. Concerning the synthesis of new biosorbents having high characteristics (high sorption capacity, disinfection efficiency, simplicity of the process, environmental friendliness, long service life) is one of the most promising methods of disinfection. Three types of seaweed, differing in composition and structure, were selected as carriers for obtaining sorbents. Algae have the ability to form clathrates due to its unique structure.

Sorbents based on seaweed of the species *Cystosiria barbata*, *Zostera marina*, *Phyllophora nervosa* and a disinfectants: iodine and iodinol were obtained. Shown that the obtained biosorbents have a high disinfecting ability, which depends on both the structure and structure of the algae and the composition and structure of the disinfecting agent.

Keywords: seaweed, iodine, polyvinyl alcohol, clathrate formation, biosorbents, water disinfection, disinfecting ability.

Обеспечение населения чистой питьевой водой является мировой проблемой. Исходя из этого, синтез новых материалов, обладающих лучшими сорбционными и обеззараживающими свойствами, остается актуальной задачей.

В качестве основы для синтеза сорбентов были выбраны три вида морских водорослей: *Cystoseira barbata*, *Zostera marina* и *Phyllophora nervosa*. Водоросли имеют внутреннюю гидрофильную поверхность и сквозную гидрофобную полость, которая сопоставима с размерами многих органических и неорганических молекул, что и обуславливает их способность к клатратообразованию [2].

В качестве обеззараживающего средства выбраны два дезинфицирующих агента, известные своими антимикробными свойствами: йод и йодиол. Установлено, что при образовании йодиола происходит формирование супрамолекулярных структур спирального типа на основе поливинилового спирта с включенными в них нанопочками йода [1]. Поливиниловый спирт замедляет выделение йода в препарате.

Для получения биосорбентов разные виды сухих водорослей предварительно выдержали в течение 2 суток в воде (для набухания водорослей, раскрытия пористой структуры), а потом насытили йодом (10 %) или йодиолом в течение суток. Получили 12 образцов биосорбентов.

Количество йода или йодиола, которое взаимодействует с водорослями и входит в состав клатратов, определяли по увеличению массы материала до и после обработки. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Анализ биосорбентов на сорбционную способность

Масса водорослей	<i>Cystoseira barbata</i>	<i>Zostera marina</i>	<i>Phyllophora nervosa</i>
Массовая доля (%) йода в составе сорбента	24,5	38,0	54,2
Массовая доля (%) йодиола в составе сорбента	66,5	56,4	72,3

Различное количество сорбированного йода и йодиола в составе водорослей связано с разной структурой и строением межплоскостных слоев. Внутренняя полость водоросли вида *Phyllophora nervosa* достаточно велика и хорошо подходит для полного включения как молекул йода, так и более крупных молекул йодиола. Низкое содержание йода в составе биосорбента на

основе *Cystoseira barbata* объясняется тем, что внутренний слой водоросли состоит из микрофибриллярного скелета, который придает стенке жесткость [3].

В данной работе проведен эксперимент по обеззараживанию воды в статистическом режиме. В качестве фактора заражения воды взята культура *Escherichia coli*. Анализ обсемененности в воде проводился до и после процесса очистки для определения обеззараживающей способности методом десятичных разведений и последующим высевом на чашки Петри методом Коха. Из полученных результатов (табл. 2) видно, что биосорбенты эффективно очищают воду. При этом йод взаимодействует с гидроксильными группами белков бактериальной оболочки, нарушая их структуру.

Таблица 2

Результаты обеззараживания воды в статистическом режиме

№ п/п	Описание водорослей	Конц. <i>E.coli</i> в воде до очистки, 10 ⁶ КОЕ/1 мл	Конц. <i>E.coli</i> в воде после очистки, 10 ⁶ КОЕ/1 мл	Процент очистки, %	Конц. йода в воде, н.
1	Cb + I ₂	44	10	77,3	0
2	Zm + I ₂	52	0,1	99,8	0
3	Pn + I ₂	90	70	22,2	0
4	Cb + йодиол	27	6	77,8	0
5	Zm + йодиол	10	2	80,0	0
6	Pn + йодиол	10	0	100,0	0
7	Cb + ПВС + I ₂	90	10	88,9	0
8	Zm + ПВС + I ₂	25	0	100,0	0
9	Pn + ПВС + I ₂	52	1,1	97,9	0
10	Cb + ПВС + йодиол	55	10	80,0	0
11	Zm + ПВС + йодиол	3	0	100,0	0
12	Pn + ПВС + йодиол	36	15	58,3	0

Примечание: Cb – *Cystoseira barbata*; Zm – *Zostera marina*; Pn – *Phyllophora nervosa*.

Таким образом, полученные биосорбенты на основе морских водорослей и йода или йодиола обладают высокой обеззараживающей способностью и могут быть использованы при очистке питьевой воды. Однако для определения сорбента с лучшими свойствами необходимо испытать их в динамическом режиме, изучить

кинетику десорбции йода из состава сорбента, определить ресурс работы сорбента по объему обеззараженной воды.

Список литературы

1. Абдуллаев О.А., Сергиенко А.В., Ивашев М.Н. Клиническая эффективность йодиола // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 3-1. – С. 47–48.
2. Наноструктурное капсулирование йода в поливиниловом спирте / Н.Н. Божко, В.П. Столяров, Н.Н. Баранов, Е.Б. Баблюк, В.Г. Назаров // Перспективные материалы. – 2010. – № 2. – С. 56–62.
3. Тоичкин А.М., Фирсов Ю.К. Морфометрические характеристики бурой водоросли *Cystoseira barbata* как показатель качества прибрежных вод Черного моря // Экология моря. – 2008. – № 76. – С. 54–60.

Об авторах

Цыпкина Екатерина Алексеевна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: Cypkinakatya@mail.ru.

Пан Лариса Сергеевна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: vvv@pstu.ru.

С.Б. Чачина, Е.П. Чачина

**ВЕРМИРЕМИДИАЦИЯ ГРУНТА, ЗАГРЯЗНЕННОГО
ОТРАБОТАННЫМ МАШИНЫМ МАСЛЯНЫМ ТОПЛИВОМ (50 Г/КГ),
С ПРИМЕНЕНИЕМ ВЕРМИКУЛЬТУР *D. VENETA*, *E. ANDREI*,
E. FETIDA, А ТАКЖЕ ИХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР**

Был изучен состав микрофлоры следующих копролитов: *D. Veneta*, *E. Andrei*, *E. Fetida*. Из копролитов также выделены особые микроорганизмы – нефтедеструкторы, на основе которых получены такие микробиологические препараты, как «Калифорнийский», «Дендробена», «Навозный». Проведена рекультивация почв, загрязненных отработанным автомобильным маслом, концентрации 50 г/кг при совместном использовании препаратов и дождевых червей *D. Veneta*, *E. Andrei* и *E. Fetida*. Высокая результативность исследований была выявлена при совместном использовании препаратов: *E. Andrei* с препаратом «Калифорнийский» – 80 % и *E. Fetida* с препаратом «Навозный» – 68 %. *E. Andrei* и препарат «Навозный» – эффективность 68 %. Дождевые черви обладают огромным потенциалом для выведения углеводородных соединений из грунта и в концентрации до 50 г/кг.

Ключевые слова: машинное масло, биоремедиация, дождевые черви

S.B. Chachina, E.P. Chachina

**VERMIDIATION OF SOIL CONTAMINATED WITH USED
ENGINE OIL FUEL (50G / KG) USING VERMICULTURES *D. VENETA*,
E. ANDREI, *E. FETIDA*, AS WELL AS THEIR PROBIOTIC CROPS**

In this article, the composition of the microflora of the following coprolites *D. Veneta*, *E. Andrei*, *E. Fetida*. Special microorganisms, oil destructors, were also isolated from coprolites, on the basis of which such microbiological preparations as "Californian", "Dendrobena", "Dung" were obtained. Reclamation of soils contaminated with waste automobile oil, concentration 50 g / kg, with the combined use of preparations and earthworms *D. Veneta*, *E. Andrei* and *E. Fetida* was carried out. High efficiency of the research was revealed with the combined use of drugs: *E. Andrei* with Californian – 80 % and *E. Fetida* and Dung – 68 %. *E. Andrei* and the drug "Dung" – efficiency 68 %. Earthworms have enormous potential for removing hydrocarbon compounds from the soil and in concentrations up to 50 g / kg.

Keywords: engine oil, bioremediation, earthworms.

Введение

Машинное масло является продуктом химического производства и обладает огромным потенциалом к ухудшению состояния окружающей среды. По данным Департамента природопользования и охраны окружающей среды Российской Федерации, 85 % моторного масла сливается в канализацию ненадлежащим образом, на землю, мусорные баки. В европейской части в окружающую среду попадает примерно 25 % объема всех ранее использованных топливных масел и 75 % собирается для повторного применения, из которых 25 % идет на регенерацию, а 49 % применяется как топливо и лишь 1 % уничтожается [1].

Для эффективного очищения нефтезагрязненных площадей активно используются термические, физические и химические методы [2]. Недостаток методов в том, что они относительно дороги и малоэффективны [3]. Биоремедиация – это экологически возможный способ рекультивации нефтезагрязненных участков, подразумевающий использование биологически активных агентов (животный и растительный компост, грибы, бактерии, водоросли с биогумусом) [2]. Микроорганизмы, используемые для проведения биоаугментации, могут быть выделены из загрязненной почвы или других объектов, например из копролитов червей. Авторы статьи [4] отмечали высокую способность дождевых червей к рекультивации почв, загрязненных нефтью, ПАУ, полихлорированными бифенилами.

Цель работы – изучение возможности использования навозного червя (*E. fetida*), калифорнийского червя (*E. andrei*), дендробена венета (*D. veneta*) и кишечной микрофлоры для очистки почвы от загрязнения отработанным машинным маслом в концентрации 50 г/кг.

Результаты и обсуждение

Был изучен состав микрофлоры следующих копролитов: *D. veneta*, *E. andrei*, *E. fetida*. Из копролитов также выделены особые микроорганизмы – нефтедеструкторы – с использованием среды Раймонд. Состав микроорганизмов-копролитов червей был определен методом MALDI-TOF. Идентификация производилась с помощью базы данных Biotyper 3 (Biomerieux, Франция) в Санкт-Петербургском НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. На основе микроорганизмов-нефтедеструкторов были получены такие микробиологические препараты, как «Калифорнийский», со-

державший *Pseudomonas putida*, *Bacillus careus*, *Bacillus mucoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus mucoides* КОЕ $1 \cdot 10^{13}$, и препарат «Дендробена»: *Enterobacter cloacae*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus careus*, *Bacillus thuringiensis*, КОЕ $1 \cdot 10^{11}$, микробиологический препарат «Навозный», который содержит *Bacillus mucoides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* *Bacillus careus*, *Bacillus thuringiensis*, КОЕ $3,3 \cdot 10^8$.

Адаптируемость дождевых червей *E. fetida*, *E. andrei*, *D. veneta* в нефтезагрязненном почвенном субстрате. В контрольном варианте (без загрязнения) общая численность *E. fetida* увеличилась девятнадцатикратно, а при добавлении биопрепарата «Навозный» 23-кратно. При добавлении препарата «Калифорнийский» общая численность *E. fetida* возросла 21-кратно, а при добавлении препарата «Дендробена» 17-кратно. В варианте с концентрацией масла 50 г/кг без добавления биопрепаратов общая численность *E. fetida* составила 11 экз. на сосуд, а при добавлении биопрепарата «Навозный» 19 экз. на сосуд. При добавлении препарата «Калифорнийский» общая численность *E. fetida* составила 13 экз. на сосуд, а при добавлении препарата «Дендробена» – 12,3 экз. на сосуд.

В контрольном варианте общая численность *D. veneta* возросла 2-кратно, а при добавлении биопрепарата «Навозный» 4,5-кратно. При добавлении препарата «Калифорнийский» общая численность *D. veneta* возросла 4,3-кратно, а при добавлении препарата «Дендробена» 7-кратно. В варианте с концентрацией моторного масла 50 г/кг и без внесения биопрепаратов общая численность *D. veneta* снизилась до 1,3 экз. на сосуд. При внесении биопрепаратов «Навозный», «Калифорнийский», «Дендробена» общая численность вермикультур снизилась до 2 экз. на сосуд.

В контрольном варианте (без загрязнения) общая численность *E. andrei* возросла 10-кратно, а при добавлении биопрепарата «Навозный» 14-кратно. При добавлении препарата «Калифорнийский» общая численность *E. andrei* увеличилась 16-кратно, а при добавлении препарата «Дендробена» 12-кратно. В варианте с концентрацией масла 50 г/кг без внесения биопрепаратов общая численность *E. andrei* составила 9 экз. на сосуд, при добавлении биопрепарата «Навозный» – 20,3 экз. на сосуд. При добавлении препарата «Калифорнийский» общая численность *E. andrei* соста-

вила 13,3 экз. на сосуд, а при внесении биопрепарата «Дендробена» – 13 экз. на сосуд.

Рекультивация почв, подверженных загрязнению отработанным маслом. В процессе рекультивации грунта, загрязненного моторным маслом 50 г/кг совместно с *D. Veneta*, концентрация моторного масла снизилась за 4 месяца до 33,9 г/кг (результативность 32,2 %). После добавления биопрепарата «Навозный» к загрязненному субстрату при совместном использовании *D. veneta* концентрация моторного масла снизилась до 29,9 г/кг (результативность 40,2 %), а с добавлением биопрепарата «Калифорнийский» концентрация отработанного моторного масла была снижена до 28,1 г/кг (эффективность 43,8 %). При добавлении препарата «Дендробена» к маслозагрязненному субстрату совместно с использованием *D. veneta* концентрация моторного масла снизилась до 21,2 г/кг (результативность 57,6 %).

В процессе рекультивации грунта, загрязненного моторным маслом 50 г/кг совместно с *E. andrei*, концентрация нефти снизилась за 4 месяца до 35,4 г/кг (результативность 29,2 %). После добавления биопрепарата «Навозный» к маслозагрязненному субстрату совместно с *E. andrei* концентрация моторного масла снизилась до 16 г/кг (результативность 68 %), а с добавлением биопрепарата «Калифорнийский» концентрация моторного масла была снижена до 10,3 г/кг (результативность 79,4 %). При добавлении биопрепарата «Дендробена» к загрязненному субстрату совместно с *E. andrei* концентрация моторного масла была снижена до 25,8 г/кг (результативность 48,4 %).

Наибольшая эффективность очистки почв, загрязненных отработанным машинным маслом, отмечена при совместном использовании препарата *E. andrei* и препарата «Навозный» – результативность 68 % и *E. andrei* с препаратом «Калифорнийский» – 80 %, *E. fetida* и препарата «Навозный» – 68 %.

Установлена высокая степень корреляции между численностью вермикультур *E. fetida* и *E. andrei* внесением препарата «Навозный» ($r = 0,98$), а также между численностью вермикультур *D. veneta* ($r = 0,91$). Установлена высокая степень корреляции между численностью вермикультур *E. fetida* и *E. andrei* внесением препарата «Калифорнийский» ($r = 0,97$). Далее была проведена оценка различий показателей выживаемости вермикультуры *Eisenia fetida* в образцах грунта, загрязненного использованным автомобильным

маслом, в том числе с использованием биопрепаратов «Дендробена», «Калифорнийский» «Навозный». Результаты подтверждают отсутствие стимулирующего действия препарата «Калифорнийский» на нормальное существование *Eisenia fetida* в грунте, который был загрязнен автомобильным топливом, но было отмечено стимулирующее влияние биопрепарата «Навозный».

Список литературы

1. Саркисов О.Р. Экологическая безопасность и эколого-правовые проблемы в области загрязнения окружающей среды. – М.: Юнити-Дана, 2012. – 125 с.
2. Frick C.M., Farrell R.E., Germida J.J. Assesment of phytoremediation as an insituechnique for cleaning oil contaminated sites / PTAC Petroleum Technology Alliance. – Canada, Calgary, 1999.
3. Lundstedt S., Haglund P., Oberg L. Degradation and formation of polycyclic aromatic compounds during bioslurry treatment of an aged gasworks soil // Environ. Toxicol. Chem. – 2003. – Vol. 22. – P. 1413–1420.
4. Glick B.R. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment // Biotechnol. Adv. – 2003. – Vol. 21. – P. 383–393. DOI:10.1016/S0734-9750(03)00055-7

Об авторах

Чачина Светлана Борисовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры «Биотехнология, технология общественного питания и товароведение», Омский государственный технический университет, e-mail: ksb3@yandex.ru.

Чачина Елизавета Павловна – студентка бакалавриата кафедры «Биотехнология, технология общественного питания и товароведение», Омский государственный технический университет, e-mail: Liza.chachina@yandex.ru.

О.С. Шевченко, С.В. Нехорошев

**МИНЕРАЛЬНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ ОСИНЫ
ОБЫКНОВЕННОЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ
ХАНТЫ-МАНСИЙСКОГО АВТОНОМНОГО ОКРУГА – ЮГРЫ**

Листья осины обыкновенной являются перспективным и мало изученным объектом исследования с позиций технологий в самых разнообразных областях. Одним из важных направлений в области изучения богатого состава листьев осины является минеральный состав. Микроэлементы очень важны для организма человека, в особенности для людей, проживающих в районе севера. Проведено фитохимическое исследование минеральной составляющей листьев осины обыкновенной, произрастающей на территории Ханты-Мансийского автономного округа – Югры. С помощью метода АЭС с ИСП велось определение микро- и макроэлементов. В ходе экспериментов изучался элементный химический состав листьев осины обыкновенной, а также почва, на которой произрастали эти растения. Натрий и кальций были обнаружены в высоком содержании, хотя в почве содержались в малом количестве.

Ключевые слова: микроэлементы, осина, листья, минеральный состав.

O.S. Shevchenko, S.V. Nekhoroshev

**MINERAL COMPOSITION OF THE LEAVES
OF THE COMMON ASPEN GROWING ON THE TERRITORY
OF THE KHANTY-MANSI AUTONOMOUS OKRUG-YUGRA**

The leaves of the common aspen are a promising and poorly studied object of research from the standpoint of technologies in a wide variety of fields. One of the important directions in the field of studying the rich composition of aspen leaves is the mineral composition. Trace elements are very important for the human body, especially for people living in the north. In this work, a phytochemical study of the mineral component of the leaves of common aspen c, growing on the territory of the Khanty-Mansi Autonomous Okrug – Ugra, was carried out. Micro – and macronutrients were determined using the NPP-ICP method. In the course of the experiments, the elemental chemical composition of the leaves of the common aspen was studied, as well as the soil on which these plants grew. Sodium and calcium were found to be high in content, although they were found to be low in the soil.

Keywords: trace elements, aspen, leaves, mineral composition.

Осина обыкновенная (тополь дрожащий) является одним из перспективных источников биологически активных и питательных веществ, используется в народной медицине [1]. Одними из основных факторов, которые оказывают влияние на химический состав осины обыкновенной, являются факторы окружающей среды [2]. Наиболее важными для организма человека являются 25 элементов: стронций (Sr), литий (Li), марганец (Mn), медь (Cu), ванадий (V), йод (I), кальций (Ca), селен (Se), магний (Mg), олово (Sn), никель (Ni), хром (Cr), фосфор (P), железо (Fe), цинк (Zn)), мышьяк (As), калий (K), натрий (Na), алюминий (Al), кобальт (Co), кадмий (Cd), кремний (Si), свинец (Pb), бор (B), ртуть (Hg) [3].

С помощью метода АЭС с ИСП велось определение микро- и макроэлементов. Прибор, используемый для анализа, был NexION 300D, оснащенный газонаполняемой ячейкой системы DRC для удаления интерференций и семипортовым дозирующим клапаном FAST, а также автодозатором ESISCDX4. Вытяжки подвижной формы элементов из образцов почвы получали с применением ацетатно-аммонийного буферного раствора (pH = 4,8) по известной методике «Пробоподготовка к измерению спектральными методами массовых долей подвижных форм металлов в почвах» (ПНД Ф 16.2.2:2.3.71–2011). Полученные вытяжки анализировались аналогично минерализованным пробам растительного сырья. Пробы растительного сырья и почвы, на которой оно произрастало, отбирались в первой декаде августа 2020 г. в 20 км от г. Ханты-Мансийска. Возраст обследованных растений находился в диапазоне 5–7 лет.

В ходе экспериментов изучался элементный химический состав листьев осины обыкновенной, а также почвы, на которой произрастали эти растения. Результаты определения содержания 25 элементов в листьях осины и в почве приведены в таблице.

Результаты элементного анализа

Элемент	Среднее значение содержания элементов в образцах, мкг/г	
	<i>Populus tremula L.</i>	Почва
Na	1003	110
K	3414	93
Mg	1358	171
Ca	2483	731
Li	0,23	0,05

Окончание таблицы

Элемент	Среднее значение содержания элементов в образцах, мкг/г	
	<i>Populus tremula L.</i>	Почва
Co	1,86	0,16
Fe	13	254
Cr	0,10	0,36
Cu	1,21	0,59
Se	0,05	0,01
P	1784	52
Ni	2,81	0,93
Mn	126	16
Si	262	22
Sn	0,13	0,14
I	0,13	0,09
V	0,04	0,12
Zn	28	2
Al	15,3917	55,1167
As	0,05	0,05
B	16,84	0,52
Hg	0,067	0,011
Pb	0,11	1,06
Sr	18	5
Cd	0,080	0,017
Сумма	10 528	1515

В ходе анализа было установлено, что магний и калий, а также натрий и кальций были обнаружены в высоком содержании, хотя в почве содержались в малом количестве. Также высокие показатели были у элементов: кобальт (Co) и марганец (Mn), фосфор (P) и цинк (Zn).

Список литературы

1. Лобанова И.Ю. Изучение динамики накопления флавоноидов в листьях осины обыкновенной // Молодежь – Барнаулу: материалы XII гор. науч.-практич. молодых ученых, г. Барнаул, 17–22 ноября 2010 г. – Барнаул, 2010. – С. 23–24.
2. Осина обыкновенная как перспективный источник получения препаратов противовоспалительного и противовоспалительного действия / В.Ф. Турецкова [и др.] // Сиб. мед. журн. – 2011. – № 5. – С. 106–111.

3. Корчина Т.Я., Корчин В.И. Витамины и микроэлементы: особенности северного региона. – Ханты-Мансийск: Новости Югры, 2014. – 516 с.

Об авторах

Шевченко Олеся Сергеевна – студентка, Югорский государственный университет, e-mail: olesua.1999@mail.ru.

Нехорошев Сергей Викторович – главный научный сотрудник проблемной научно-исследовательской лаборатории, Ханты-Мансийская государственная академия, доктор технических наук, профессор кафедры «Химия», Ханты-Мансийская государственная медицинская академия, e-mail: serg-nehor@rambler.ru.

О.Л. Широбокова, Е.В. Лепехина

ФЕРМЕНТАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО МОЛОКА

Основным направлением исследования является получение йогурта. Также важной частью является изучение и экспериментальное исследование различных микроорганизмов, присутствующих в полученном продукте. Данная тема является актуальной, так как в современном мире все больше людей сталкиваются с непереносимостью лактозы. Как альтернативу решения этой проблемы автор проекта предлагает использовать растительное молоко вместо животного. Изучив теорию по данной теме, выполнили практическую часть работы, проанализировали результаты исследований, рассмотрели их практическое применение. Данная работа носит исследовательский характер.

Ключевые слова: ферментация, растительное молоко, лактоза, микроорганизмы.

O.L. Shirobokov, E.V. Lepekhina

FERMENTATION OF VEGETABLE MILK

The main direction of the research work "Fermentation of vegetable milk" is the production of yogurt. Also an important part is the study and experimental study of the various microorganisms present in the resulting product. This topic is relevant, as in the modern world more and more people are faced with lactose intolerance. As an alternative to solving this problem, the author of the project suggests using vegetable milk instead of animal milk. Having studied the theory on this topic, the practical part of the work is carried out, the results of research are analyzed, their practical application is considered. This work is of a research nature.

Keywords: fermentation, vegetable milk, lactose, microorganisms.

Среди пищевых продуктов, имеющих особое значение для поддержания здоровья человека и его адаптации к неблагоприятным условиям окружающей среды, важная роль принадлежит кисломолочным продуктам. Кисломолочные продукты содержат необходимые для организма вещества в легкоусвояемой форме, а также способствуют восстановлению микрофлоры желудочно-кишечного тракта после антибиотиков. Традиции потребления кисломолочных продуктов, активно пропагандируемое в настоящее время «здоровое питание» обеспечивают на рынке устойчивый спрос на такие продукты, в частности на йогурты. Основной ком-

понент при производстве йогурта – молоко. Именно от его качества будет зависеть процесс сквашивания и качество готового продукта.

Долгое время коровье молоко считалось одним из самых здоровых продуктов, так как в нем имеется высокое содержание кальция и, следовательно, благодаря регулярному употреблению молока у человека должны быть крепкие зубы и кости, защита от развития остеопороза. Однако последние исследования показывают, что молоко не только малоэффективно против этого заболевания, но и содержит ингредиенты, которые повышают риск развития рака. Также есть данные, что именно из-за молока в крови человека образуются атеросклеротические бляшки, что увеличивает угрозу инфаркта. Лактоза является главным углеводом молока. Ее содержание в коровьем молоке составляет в среднем 4,6 % [1]. В настоящее время большинство людей сталкиваются с непереносимостью лактозы. У таких людей возникают различные аллергические реакции. Поскольку лактоза – это молочный сахар, содержащийся в животном молоке. Люди вынуждены отказываться от молока. Сейчас становится очень популярным растительное молоко. Цель работы – производство йогурта из растительного молока. Для достижения цели необходимо поставить следующие задачи:

- изучить технологию ферментации растительного молока;
- изучить виды растительного молока;
- изучить виды бактерий, сбраживающих растительное молоко;
- изучить закваски для получения йогурта;
- оценить готовый продукт по органолептическим свойствам.

Гипотеза: йогурт на основе растительного молока будет усваиваться лучше, чем йогурт на животном молоке у людей с непереносимостью лактозы.

Проблема: невозможность употреблять кисломолочные продукты людям с лактазной недостаточностью.

Актуальность: Широкое распространение первичной и вторичной лактазной недостаточности среди населения ограничивает использование продуктов ферментации на основе молока животных.

Методы исследования: изучение и анализ литературы, проведение эксперимента, анализ полученных данных.

Практическая часть. Практическая часть исследования состояла из следующих этапов:

1. Подготовка и стерилизация микробиологической посуды.
2. Добавление закваски в молоко.

3. Приготовление продукта в йогуртнице.
4. Окраска микроорганизмов.
5. Просмотр окрашенных культур под микроскопом.

В качестве закваски использовали препарат Lactobif. В одной капсуле содержится 5 млрд КОЕ. Пробиотик Lactobif от California Gold Nutrition содержит восемь активных и клинически изученных штаммов пробиотиков (<https://mir-herb.ru/obzory-tovarov/probiotiki-lactobif-ot-california-gold-nutrition-opisanie-pokazaniya.html>).

В ходе первого опыта в стеклянные баночки для йогурта налили по 150 мл кокосового молока и нагрели до 40 °С. В первую баночку налили 150 мл молока и растворили в ней одну капсулу сухого биопрепарата при интенсивном перемешивании. Во вторую баночку поместили половину капсулы и размешивали до полного растворения. Заквашенное молоко закрыли крышкой и поместили в йогуртницу при температуре 40 °С на 12 ч [3]. В результате был получен продукт из кокосового молока, который имеет однородный состав. Получилась белая, вязкая масса. Было обнаружено небольшое расслоение готового продукта, но это не вредит его дальнейшему использованию.

Также провели исследование микрофлоры микроорганизмов, в результате которого обнаружили, что в продукте большинство грамотрицательных микроорганизмов, что не соответствует молочнокислым бактериям. Возможно, из-за того, что окраска была проведена спустя 7 суток после приготовления йогурта, потому что способность клеток окрашиваться по Граму зависит от их возраста. Ввиду этого красить по Граму всегда следует клетки молодых, чаще всего одноклеточных культур. Одновременно целесообразно окрашивать клетки микроорганизмов, отношение которых к окраске по Граму заранее известно.

В ходе второго опыта в стеклянные баночки для йогурта наливаем по 150 мл кокосового молока и нагреваем на водяной бане до 80 °С. Затем остужаем до 40 °С. В первой баночке растворяем одну капсулу сухого биопрепарата при интенсивном перемешивании. Во второй баночке помещаем половину капсулы и размешиваем до полного растворения. Заквашенное молоко закрыли крышкой и поместили в йогуртницу при температуре 40 °С на 12 ч. В ходе работы был получен продукт из кокосового молока, который имеет однородный состав. Получилась белая, вязкая масса. Было обнаружено более сильное расслоение готового продукта. Была проведена

окраска живых микроорганизмов генциановым фиолетовым и метиленовым синим. В результате окраски четко были видны небольшие цепочки из четырех, трех и двух единиц, а также палочковидные клетки. Предположительно, это могут быть *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium longum*. Также провели исследование микрофлоры микроорганизмов, в результате которого обнаружили, что в продукте присутствуют грамотрицательные и грамположительные микроорганизмы.

Полученные результаты позволили сделать вывод: полученный продукт по органолептическим свойствам соответствует йогурту на основе растительного молока, который содержит пробиотики. Ввиду этого продукт из растительного молока можно использовать как источник пробиотиков с таким же успехом, как и из животного молока. В дальнейшем планируется подбор условий ферментации для получения продукта с меньшим количеством Гр-микроорганизмов.

Список литературы

1. Оллли Тоссавайнена, Преимущества молока без лактозы // Молочная промышленность. – М., 2008. – № 7. – С. 55–56.
2. Виноградова А.В., Портнова А.В., Анашкина Е.Н. Основы биотехнологии: лаб. практикум. – Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2017. – 44 с.

Об авторах

Широбокова Ольга Леонидовна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: shirobokovaolyasik.ru@mail.ru.

Лепехина Елена Владимировна – кандидат биологических наук, доцент кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: alenshick@mail.ru.

О.А. Шулькина, А.Ю. Максимов

**МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ
КОНЦЕНТРАЦИЙ СУБСТРАТОВ НА СКОРОСТЬ РОСТА
ШТАММА *ALCALIGENES FAECALIS* 2**

Исследовано влияние ацетонитрила и ацетамида как источников углерода и азота на удельную скорость роста микроорганизмов *A. faecalis* – продуцентов гидролитических ферментов. Построена математическая модель и проведена оценка влияния культивирования на скорость роста микроорганизмов методом математического планирования.

Ключевые слова: *Alcaligenes faecalis*, ацетамид, ацетонитрил, гетерогенный биокатализ, гидролитические ферменты.

O.A. Shchulkina, A.Y. Maksimov

**MATHEMATICAL MODELING OF THE EFFECT
OF SUBSTRATE CONCENTRATIONS ON THE GROWTH
RATE OF OF THE STRAIN *ALCALIGENES FAECALIS* 2**

The effect of acetonitrile and acetamide as sources of carbon and nitrogen on the specific growth rate of microorganisms *A. faecalis*, producers of hydrolytic enzymes, has been studied. A mathematical model was built and the impact of cultivation on the growth rate of microorganisms was assessed by the method of mathematical planning.

Keywords: *Alcaligenes faecalis*, acetamide, acetonitrile, heterogenic biocatalysis, hydrolytic enzymes.

Известно, что от состава питательной среды зависят скорость роста микроорганизмов – продуцентов внутриклеточных ферментов, выход биомассы и продукция целевого фермента и, как следствие, функционирование гетерогенного биокатализатора. Вследствие этого подбор питательной среды очень важен для биотехнологических производств. Сырье для процессов ферментации должно содержать необходимые элементы для построения биомассы микроорганизмов. Наиболее важным для оптимизации продуктивности микроорганизмов, катализирующих гидролиз амидов и нитрилов – нитрилаз и амидаз, является подбор необходимых элементов питательной среды углерода и азота.

Целями работы являются изучение зависимости скорости роста *A. faecalis* – продуцента ферментов от сочетаний используемых субстратов и получение уравнения регрессии, по которому можно в дальнейшем проводить математический расчет для прогнозирования скорости роста по заданным концентрациям субстратов, что важно при масштабировании процесса культивирования [1].

Материалы и методы исследования

Объект исследования: штамм *Alcaligenes faecalis* 2, метаболизирующий нитрилы и амиды [2]. В качестве варьируемых факторов среды были выбраны концентрация ацетонитрила $C_{АН}$ и ацетамида $C_{АА}$, которые использовались в качестве углеродного и азотного субстратов в процессе роста *A. faecalis*. Для культивирования использовали универсальную минеральную среду N^- с добавлением раствора микроэлементов [3].

Результаты и обсуждение

Исследована удельная скорость роста при разных сочетаниях двух субстратов – ацетонитрила и ацетамида, добавленных в среду в концентрациях 10 или 100 мМ. Результаты представлены в табл. 1 и взяты в качестве матрицы планирования для последующих расчетов.

Таблица 1

Исходная матрица планирования 2^2

Номер опыта	Изучаемые факторы		Удельная скорость роста, $ч^{-1}$		
	$C_{АН}$, мМ	$C_{АА}$, мМ	y_1	y_2	y_3
1	100	100	0,0276	0,0270	0,0279
2	100	10	0,1365	0,1370	0,1366
3	10	10	0,0271	0,0278	0,0266
4	10	100	0,1261	0,1267	0,1257

Полный факторный эксперимент был проведен соответственно следующей схеме [4]: $N = 2^k$, где N – число опытов, k – число факторов, 2 – число уровней.

Обозначим значения изучаемых факторов через x_i , тогда середина интервала будет записываться как:

$$x_i^0 = \frac{x_{i\text{мин}} + x_{i\text{макс}}}{2},$$

где $x_{i\text{мин}}$, $x_{i\text{макс}}$ – минимальное и максимальное значения изучаемого фактора; x_i^0 – основной уровень.

Тогда интервал варьирования (Δx_i) можно записать как

$$\Delta x_i = \frac{x_{i\text{мин}} - x_{i\text{макс}}}{2}.$$

Преобразуем факторы из натурального масштаба в безразмерный:

$$X_i = \frac{x_i - x_i^0}{\Delta x_i}.$$

Тогда:

$$x_i^- = x_i^0 - \Delta x_i \rightarrow \text{обозначаем } -1;$$

$$x_i^+ = x_i^0 + \Delta x_i \rightarrow \text{обозначаем } +1.$$

В результате получена матрица планирования эксперимента с эффектом взаимодействия факторов (табл. 2).

Таблица 2

Матрица планирования эксперимента 2²
с эффектом взаимодействия факторов

Номер опыта	Исходные значения				Удельная скорость роста микроорганизмов, ч ⁻¹			Среднее значение, ч ⁻¹
	X_0	X_1	X_2	$X_1 \cdot X_2$	Y_1	Y_2	Y_3	
1	+	–	–	+	0,0276	0,0270	0,0279	0,0275
2	+	+	–	–	0,1365	0,1370	0,1366	0,1367
3	+	–	+	–	0,0271	0,0278	0,0266	0,0272
4	+	+	+	+	0,1261	0,1267	0,1257	0,1262

Проверка воспроизводимости опытов основана на гипотезе об однородности выборочных дисперсий отклика (в данном случае отклик – удельная скорость роста микроорганизмов). Определяем величины всех дисперсий:

$$S_1^2 = \frac{1}{2}((0,0276 - 0,0275)^2 + (0,0270 - 0,0275)^2 + \\ + (0,0279 - 0,0275)^2) = 0,000\,000\,210;$$

Аналогично: $S_2^2 = 0,000\,000\,070$; $S_3^2 = 0,000\,000\,365$; $S_4^2 = 0,000\,000\,255$.

Проверка воспроизводимости опытов осуществляется с помощью критерия Кохрена. При этом должно выполняться условие: $G_p \leq G_{\text{табл}}$. Вычисленный критерий Кохрена: $G_p = 0,4056$. Критерий Кохрена, найденный по таблице критических значений, $G_T = 0,7679$. Проверяем выполнение условия $0,4056 \leq 0,7679$.

Расчетное значение удовлетворяет приведенному выше условию, а, следовательно, дисперсии опытов однородны, а сами опыты воспроизводимы.

Расчитанные коэффициенты модели: $b_0 = 0,0794$; $b_1 = 0,0521$; $b_2 = -0,002675$; $b_3 = -0,00255$.

Перед проверкой значимости коэффициентов модели необходимо вычислить дисперсию единичного измерения выходного параметра, дисперсию среднего значения функции отклика и соответствующее ей среднеквадратичное отклонение.

Дисперсия единичного измерения выходного параметра

$$S_Y^2 = \frac{1}{4}(0,000\,007\,84 + 0,000\,006\,52 + 0,000\,015\,75 + \\ + 0,000\,033\,08) = 0,000\,000\,225.$$

Дисперсия среднего значения функции отклика: $S_{Y_{\text{ср}}}^2 = 0,000\,000\,075$.

Среднеквадратическое отклонение $S_{Y_{\text{ср}}} = 0,000\,273\,861\,3$.

Проверка значимости коэффициентов модели осуществляется с помощью t -критерия Стьюдента. Значения t -критерия Стьюдента для каждого коэффициента: $t_{0p} = 579,86$; $t_{1p} = 380,48$; $t_{2p} = 19,54$; $t_{3p} = 18,62$. Для определения табличного значения t -критерия Стьюдента необходимо задаться доверительной вероятностью ($P_t = 0,975$) и числом степеней свободы, которое составляет: $f = 4 \cdot (3 - 1) = 8$.

Табличное значение критерия Стьюдента $t_{\text{табл}} = 2,306$. Расчетные значения критерия Стьюдента больше табличного, поэтому

все коэффициенты модели являются значимыми. Таким образом, было получено следующее уравнение регрессии:

$$y = 0,0794 + 0,0521x_1 - 0,002\ 68x_2 - 0,002\ 55x_1x_2.$$

Проведем интерпретацию полученной модели. Известно, что чем больше величина коэффициента, тем больше фактор влияет на отклик (удельную скорость роста). Расположим коэффициенты в порядке уменьшения их влияния на отклик:

$b_1 = +0,0521$ – таким образом, наибольшее влияние играет фактор x_1 – концентрация ацетонитрила. Положительное значение коэффициента говорит о том, что с увеличением концентрации ацетонитрила увеличивается удельная скорость роста микроорганизмов.

$b_2 = -0,002\ 68$ – данный коэффициент стоит перед фактором x_2 – концентрация ацетамида. При увеличении концентрации происходит увеличение удельной скорости роста, но отрицательное значение коэффициента показывает, что с увеличением концентрации ацетамид может вызывать процесс субстратного ингибирования.

$b_3 = -0,002\ 55$ – данный коэффициент учитывает влияние обоих факторов x_1x_2 . Отрицательное значение коэффициента говорит о том, что удельная скорость роста будет возрастать при уменьшении суммарного влияния концентраций обоих субстратов. Возможно, необходимо увеличить соотношение между концентрациями субстратов.

Показано, что коэффициент при множителе x_1 больше, чем все остальные, что говорит о том, что концентрация ацетонитрила оказывает наибольшее влияние на величину скорости роста клеток.

В результате проведения математического планирования показано, что наиболее важным субстратом для клеточного роста культур *Alcaligenes faecalis* – продуцентов гидролитических ферментов является ацетонитрил. Ацетамид, в свою очередь, может играть роль субстратного ингибитора. Таким образом, процессом можно управлять путем повышения концентрации ацетонитрила за счет того, что он может оказывать стимулирующее действие в определенной концентрации.

Работа выполнена в рамках Государственного задания, номер госрегистрации АААА-А19-119112290008-4.

Список литературы

1. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. – М.: КолосС Химия, 2004. – 296 с.
2. Биodeградация акриламида и акриловой кислоты планктонными клетками и биопленками *Alcaligenes faecalis* 2 / Ю.Г. Максимова, Д.М. Васильев, А.С. Зорина, Г.В. Овечкина, А.Ю. Максимов // Прикл. биохим. микробиол. – 2018. – Т. 54, № 2. – С. 158–164.
3. Влияние нитрилов и амидов на рост и нитрилгидратазную активность штамма *Rhodococcus* sp. gt1 / А.Ю. Максимов, М.В. Кузнецова, Г.В. Овечкина, С.В. Козлов, Ю.Г. Максимова, В.А. Демаков // Прикл. биохим. микробиол. – 2003. – Т. 39, № 1. – С. 63–68.
4. Соколовская И.Ю. Полный факторный эксперимент: метод. указания для самост. раб. студентов / НГАВТ. – Новосибирск, 2010. – 36 с.

Об авторах

Щулькина Ольга Александровна – студентка бакалавриата кафедры «Химия и биотехнология», Пермский национальный исследовательский политехнический университет, e-mail: olga.remizova.97@mail.ru.

Максимов Александр Юрьевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, e-mail: almaks1@mail.ru.

UDC 543.544.3

A.V. Rullo, A.D. Badikova, D.A. Danilova, R.Kh. Masagutov

GEOCHEMICAL EXPLORATION OF OIL AND GAS IN THE SUBSURFACE ON A MODIFIED CARBON ADSORBENT USING PROJECTION APPROACHES TO THE ANALYSIS OF A DATA ARRAY OF CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

A promising method for searching for oil and gas is the technology of passive adsorption of soil-ground gas hydrocarbons using projection approaches to the analysis of the data array of chromatography-mass spectrometry. Field studies were conducted under real geochemical conditions. Acceptance was evaluated by gas chromatography-mass spectrometry on a single Shimadzu GCMS-QP 2020 instrument using a Markes Unity2 thermal desorber.

The discriminant method of projections on latent structures (PLS-DA-partial least squares) allows us to establish a relationship between chromatographic data and regression responses of the matrix D, which are later used to estimate the oil content of territorial objects.

The result of the PLS-DA processing of the data array was converted into a map of the probability of detecting oil and gas deposits for subsequent geochemical assessment.

Keywords: adsorption, adsorbents, module-sorber, passive adsorption, gas chromatography-mass spectrometry, thermal desorption, PLS-DA.

It is known that specific oil or gas compounds are formed as a result of the vertical migration of hydrocarbons from oil and gas deposits in the subsurface and accumulate in the soil layer in the projection of these deposits. The internal normalization method, which is common for studies using chromatography-mass spectrometry, allows us to compare the quantitative and qualitative compositions of hydrocarbons captured over the study area with similar values of hydrocarbons over productive / dry standards. Further processing of the results of chemical analyses is carried out by mathematical statistical methods, which allows us to obtain the dependences of the distribution of hydrocarbons in the areas of interest, and, consequently, on the oil and gas deposits developed in the underlying sediments. The sorber module used for field geochemical survey and subsequent analysis

in the laboratory consists of an adsorbing material (composition) placed in a mesh metal sleeve, in turn, placed in a special waterproof membrane. The Tuimazinsky field was discovered by a well drilled in the uplift arch and uncovered an oil deposit in the carbonate deposits of the Middle Yamen sub-stage of the Upper Devonian.

Thus, given the set industrial oil content within the project area on Tuimazinsky field and adjacent areas Subkhankulovo, Seraphim of the fields on a given license area observed the main prospects for the search for new oil deposits. The Tuimazinskoye field was discovered by a well drilled in the uplift arch and uncovered an oil deposit in the carbonate deposits of the Middle Famennian substrate of the Upper Devonian.

Thus, taking into account the established industrial oil content within the project site at the Tuimazinsky field, the main prospects for the search for new oil fields are observed. In this regard, to construct the rules for the selection of territorial objects, we used the discriminant method of projections on latent structures (PLS-DA or in English PLS – DA-partial least squares) for processing chromatography-mass spectrometric data obtained using a modified carbon adsorbent in the composition of module sorbers.

The result of the PLC-DA processing of the data array was transformed into a map of the probabilities of finding oil and gas deposits for subsequent geochemical assessment of the oil and gas content of the subsurface. For the formed training sample, we will use a group of 50 module-sorbers, 25 of which belong to the "DRY" group (dry) and were exhibited in the immediate vicinity of the well without signs of oil and gas content, 25 others belong to the "OIL" group - they were exhibited in the immediate vicinity of the well with confirmed evidence of oil and gas content.

Using this group of "reference" module-sorbers, we will establish the rules for dividing all sorbers into groups, i.e., we will define linear discriminant functions. Then, using LDF, we will divide all the field module-sorbers into two groups "OIL" and "DRY". There are two special clusters in the graph of the CIM data modeling accounts. These clusters differ in the peak area for all hydrocarbon components. Cluster A is characterized by the presence of hydrocarbons throughout the study area, as well as the presence of reference compounds: iso-pentane, methylcyclopentane, 2-methylhexane, cyclohexane, cis-1,2-dimethyl-cyclopentane, heptane, 1-octene, trans-1,2-dimethylcyclohexane, cis-1,4-dimethylcyclohexane, 2,6-dimethylheptane, tridecane, hexadecane.

Cluster B is not characterized by the presence of reference connections at the points of the bottom of the module-sorbers. This cluster belongs to the bush of the "dry" class oil well.

Point 35 and 47 fall out of the cluster region and are characterized by the smallest areas of chromatographic peaks for all hydrocarbon compounds.

The data obtained using The Unscrambler program is transferred to the Surfer tool to bind points to the coordinates of the terrain.

On the map of the probabilities of detecting hydrocarbon deposits, the most promising points of laying exploration wells are indicated, according to the results of geochemical studies

The results obtained with the help of the Surfer program allowed us to determine the presence or absence of oil and gas content of the reservoir in the study area. According to the data obtained, abnormally high probability values were found in the northern and south-eastern parts of the research area, as well as within several structures in the western part of the research area.

References

1. Esbensen K. Analysis of multidimensional data. Selected chapters / Translated from the English by S.V. Kucheryavsky; ed. by O.E. Rodionova. – Kazan: Publishing House of University, 2008. – 158 p.

2. Herman V. The quest for hydrocarbons using the methods of GORE in Western Siberia // Izv. Ugg. – 2011. – No. 25/26. – P. 48–52.

3. Carbon adsorbent as part of a module-sorber for the study of passive adsorption of hydrocarbons from the Baklanovskoye field oil model / A.V. Rullo, A.D. Badikova, R.I. Ableev, R.H. Masagutov, N.A. Beigul, O.P. Zhurkin, D.I. Bejan // Bashkir Chemical Journal. – 2019. Vol. 26, no. 4. – P. 32–38.

4. Sorption of hydrocarbon sorbates typical for oil fields on the surface of a Tenax polymer adsorbent / A.D. Badikova, A.V. Rullo, R.I. Ableev, N.A. Beigul, E.A. Paramonov, I.E. Alyokhina // Bulletin of the Bashkir University. – 2018. – Vol. 23, no. 4. – P. 1074–1078.

About authors

Rullo Anton Vyacheslavovich – Postgraduate Student of the 4 year of study of the Faculty of General Scientific Disciplines, Ufa State Petroleum Technological University, e-mail: rullo_anton@mail.ru.

Badikova Albina Darisovna – Doctor of Engineering Sciences, Professor, Head of the Department of Physical and Organic Chemistry, Ufa State Petroleum Technological University, e-mail: badikova_albina@mail.ru.

Danilova Diana Alexeevna – Master's Degree Student, Department of Physical and Organic Chemistry, Ufa State Petroleum Technological University.

Masagutov Rim Khakimovich – Doctor of Geological and Mineralogical Sciences, Professor Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan, e-mail: masagutovr@mail.ru.

V.E. Burov, A.N. Gallyamov, O.A. Fedotova, V.Z. Poilov

**THE ULTRASONIC TREATMENT INFLUENCE ON pH
SOLUTION OF HYDROCHLORIC AMINE**

The effect of ultrasonic treatment of amine hydrochloric solution on the pH has been studied. It was found that the pH value changes nonlinearly with a change in the duration and intensity of the ultrasonic treatment. The impact duration of 30 s and the use of all ultrasound treatment sound power increased the pH. However, further increasing the impact duration to ultrasound decreased the pH value. It was also revealed that the change in pH when using sound powers of 168, 252 and 336 W is influenced only by the ultrasound treatment duration. However, using an impact duration of 150 s, the pH changed by using different ultrasonic treatment sound power.

Keywords: hydrochloric amine, ultrasonic treatment, pH, flotation agent, collector, sylvinic flotation.

Potassium chloride is a basic product that is widely used as potash and complex fertilizers, as well as in the chemical industry (used as a raw material for the production of potassium compounds), in pharmaceuticals and medicine. About 80 % of the world's potassium chloride is produced using froth flotation, which is an efficient technology for the potash ores beneficiation. In the process of sylvinite ores flotation, KCl is separated from halite (NaCl) due to the use of various flotation reagents, including collectors, which are able to change the specific energy on the surface of sylvite (potassium chloride) [1, 2].

Collectors of an ionic (cationic) type are of great interest for flotation. In the industrial practice of sylvinite flotation from this types of collectors, amines (organic derivatives of ammonia) are widely used. [3]. Their wide use is explained by the fact that amines are selectively adsorbed on KCl crystals in acidic and neutral environments, hydrophobizing the potassium chloride surface. One of the ways to increase the efficiency of the amine collector is a dispersion of floccules using ultrasonic treatment (US-treatment), which leads to a decrease in the floccules size and an increase in floccules number of the flotation reagent. It is known [4] that due to the effect of acoustic cavitation, ultrasound is able to change various physicochemical parameters of colloidal solutions, including the pH.

For amine, which is fed to flotation in the solution form, the pH plays an important role. At pH-values in the range 2...9, the amines sorption on the sylvite crystals surface is constant, but decreases with increasing pH. The optimum amine sorption is in the range of pH 2...2.5 [3]. Hence, when using the UST of the amine flotation reagent, it is important to understand the effect of acoustic cavitation on changing the collector pH.

The research purpose is to study the effect of ultrasonic treatment on the change in the amine solution pH used as the collector in sylvinic flotation.

Materials and Methods

Primary (distilled) granular amines (fractions C17-C20, “summer” type) were used as the collector of sylvinic flotation. A solution of hydrochloric amine (HCA) was prepared with a working temperature of 60 °C.

Ultrasonic treatment of the flotation reagent was carried out using an ultrasonic generator with a piezoelectric oscillatory system made of titanium alloy in a metal case with forced air cooling, model UZTA-0.8/22-OMU of the "Volna" series of the LLC "Tsentr ul'trazvukovykh tekhnologii" (Russia). The ultrasonic installation has a nominal operating frequency of 22 ± 1.65 kHz, and a radiation intensity of at least 3.5 W/cm^2 . Electronic generator has timer and output power regulator (40-100 %). At 100% power setting, an apparent power is about 1600 V·A, a real power is about 650 W, and an acoustic power of about 420 W is injected into the system. By adjusting the power from 40 to 100 %, apparent power, real power and acoustic power change almost proportionally.

The studied parameters were the ultrasonic treatment acoustic (sound) power (from 168 to 420 W in 84 step) and the impact duration (30, 60, and 150 s).

The pH-value of the hydrochloric amine of solution was measured using a pH-meter of ANION 7000 (Russia).

Results and Discussion

The research results of acoustic power and impact duration influence of the ultrasound treatment on the HCA solution pH-value without and with ultrasound treatment at different modes are shown in Figure.

It follows from the analysis of the curves that with an increase in the US-treatment duration, the hydrochloric amine pH-value changes nonlinearly: first, it increases to a maximum value, and then

decreases to a certain value. Wherein, the most pH-value change is observed at the US-treatment acoustic power of 336 W. Increasing the ultrasound treatment sound power above this value reduces the effect of ultrasound on the change pH.

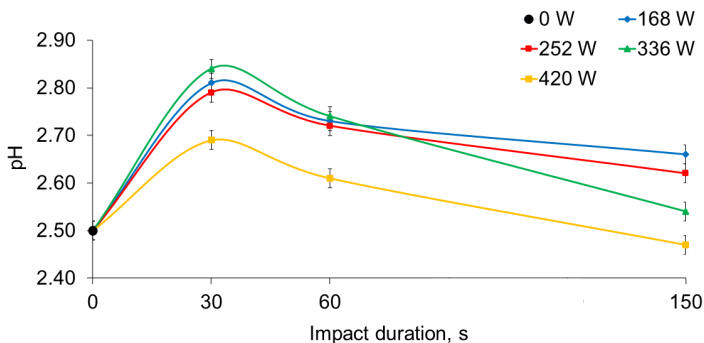


Fig. Power and duration influence of ultrasound treatment on the HCA solution pH-value

With the impact duration of 60 s and all US-treatments sound power, a decrease in the pH is observed. Wherein an ultrasound with the acoustic powers of 168, 252 and 336 W reduces the pH-value of the HCA solutions to 2.73 ± 0.02 . The pH-value decreases to 2.61 ± 0.02 after ultrasonic treatment with the sound power of 420 W.

One of the possible reasons for the change in the hydrochloric amine solution pH after ultrasound treatment is a dissociation of water under the influence of acoustic cavitation, as a result of which highly reactive $\cdot\text{H}$ and $\cdot\text{OH}$ radicals are formed, as well as hydrogen peroxide and O_2 [4, 5]. Wherein the formed H_2O_2 exhibits weak acidic properties.

Based on the above, we can conclude that ultrasonic treatment of the hydrochloric amine solution (flotation collector) influences the pH change, which should be considered in the industrial implementation of an ultrasonic treatment technology of flotation reagents emulsion, feed to flotation.

References

1. Abramov A.A. Flotatsionnye metody obogashcheniya. – Moscow: Nedra, 1993. – 412 p.

2. Specific ion effects of salt solutions on colloidal properties of octadecylamine hydrochloride / E. Li, Z. Du, D. Li, F. Cheng // *Journal of Surfactants and Detergents*. – 2017. – No. 20 (2). – P. 483–491. DOI: [org/10.1007/s11743-016-1923-7](https://doi.org/10.1007/s11743-016-1923-7)

3. Sorokin M.M. Flotatsionnye metody obogashcheniya. Khimicheskiye osnovy flotatsii / Moskovskiy gosudarstvennyy institut stali i splavov. – Moscow, 2011. – 411 p.

4. Enhancement of galena-potassium ethyl xanthate flotation system by low power ultrasound / C. Gungoren, Y. Baktarhan, I. Demir, S. Ozkan // *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. – 2020. – No. 30 (4). – P. 1102-1110. DOI: [org/10.1016/S1003-6326\(20\)65281-5](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(20)65281-5)

5. Effects of ultrasonic pre-treatment on the flotation of ilmenite and collector adsorption / K. Shu, L. Xu, H. Wu, S. Fang, Z. Wang, Y. Xu, Z. Zhang // *Minerals Engineering*. – 2019. – No. 137. – P. 124–132. DOI: [org/10.1016/j.mineng.2019.04.001](https://doi.org/10.1016/j.mineng.2019.04.001)

About authors

Burov Vladimir Evgenyevich – Postgraduate, Department of Chemical Engineering, Perm National Research Polytechnic University, e-mail: vladimire.burov@gmail.com.

Gallyamov Andrey Nikolaevich – Master, Department of Chemical Engineering, Perm National Research Polytechnic University, e-mail: andrewg96@mail.ru.

Fedotova Olga Alexandrovna – Candidate of Sciences in Technology, Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Perm National Research Polytechnic University, e-mail: chydinova.olga@rambler.ru.

Poilov Vladimir Zotovich – Doctor of Sciences in Technology, Head of Centre of Collective Usage “Center for High-Tech Chemical Technologies and Physico-Chemical Researches”, Professor, Department of Chemical Engineering, Perm National Research Polytechnic University, e-mail: vladimirpoilov@mail.ru.

L.K. Molokov, I.V. Rukavishnikova

ENVIRONMENTAL IMPACT OF WIND POWER GENERATION

The most significant aspects of the negative influence on environment of wind turbines are distinguished in this article. The essence and constituents of individual problems are considered. Some actual solutions, contributing to the decrease of the related negatory phenomena are described.

Keywords: wind turbines, alternative energy's ecology, wind power industry problems, wind turbines' life cycle's aspects.

Energy production using wind energy converters (WEC) as one of the most widespread and promising types of alternative energy has many environmental advantages compared to traditional methods of energy generation. First and foremost, it's the refusing from burning exhaustible fuels and disproportionately lower emissions of harmful substances into the atmosphere during the energy generation process. However, the use of industrial wind turbines (IWT) is also associated with several phenomena which affect harmfully on our environment. In terms of the global objective of improving energy production technologies in the least harmful way for the Earth, this article is aimed at solving the problem of identifying the main factors of the adverse impact of the wind energy industry on the environment. It is necessary for these aspects' subsequent detailed investigation and finding the particular ways of their impact reduction.

In order to systematize the factors of negative impact, we examined the relevant phenomena at the main stages of the life cycle. A typical representative of wind turbines was considered - horizontal axis wind turbines (HAWTs) with three blades. The following groups of impact types were determined: environmentally harmful effects during the production, transportation, operation, and disposal of WEC.

The functioning of wind turbines is based on a perception of powerful wind currents. This involves the strength of the elements of such formations, which is provided by the materials from which the wind turbines are made. The most unwanted effect in the production of IWT is CO₂ emission while the fabrication of materials from which components and parts of wind turbine blades are made. It is important to note that during the operation of WEC, detrimental substances are not

emitted into the air, therefore, the total emissions of the life cycle of wind generators according to the research results [1] are two orders of magnitude less than that of TPPs of the corresponding capacity.

The transportation of components to the wind turbine assembly site, as well as the transportation of the same parts to the disposal sites, brings significant harm to the environment. Transit of large blades requires high fuel costs, which causes serious damage to the environment by emitting carbon dioxide. According to the calculations carried out, for every 10 km between the location of the farm of wind turbines to the place of production of its parts or the disposal site, the delivery of the components will be accompanied by emissions of more than 1.5 tons of CO₂.

Moving on to consider the factors of the negative influence of IWT during the operation stage. One of the operational disadvantages of wind turbines is noise, which is subsequently generated by a sharp collision of air with the surfaces of the blades of the wind turbine, while infrasound (up to 20 Hz) occur (Table).

Table

The factors of the negative influence of IWT

Parameter	375-750 (601), m	751-1400 (964), m	3300-5000 (4181), m	5300-6600 (5800), m	3000-6600 (5248), m	P-Value ³
Mean PSQI ¹	8.7	7.0	6.6	5.6	6.0	0.0461
% PSQI score > 5 ²	77.8	55.0	57.1	37.0	43.9	0.0745
% Wishing to move away IWTs	77.8	70.0	0.0	0.0	0.0	<.0001

¹Pittsburgh Sleep Quality Index ²PSQI > 5 considered a ‘poor sleeper’
³Testing difference of 371-1400 m group with 3000-6000 m group.

Results of the study related to sleep quality depending on the distance from the IWTs [2].

According to a 2012 American scientists’ investigation [2], it was concluded that the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), an internationally recognized accurate indicator of a person's sleep quality, increases exponentially as the distance from a residential building in which a person sleeps to a location of the wind turbine group decreases.

In the description of the table given in [2], it is indicated that a person experiences serious problems with sleeping when the PSQI is greater than 5. With this result, the subjects who lived already at a distance of 3300 to 5000 m from the nearest wind turbines farm at the time of the experiment, had noticeable deviations in the sleeping process, as evidenced by the average indicator of 6.6 PSQI.

Analyzing the table’s data, one can observe the psychological impact on people of the presence close to the places where IWTs are concentrated. This is reflected in the last row of the table, which shows the percentage of people who want to move further from the site of the wind turbine concentration point. This average percentage of applicants has a sharp jump from zero to 70.0, for people living at a distance of 751-1400 m from the wind farm.

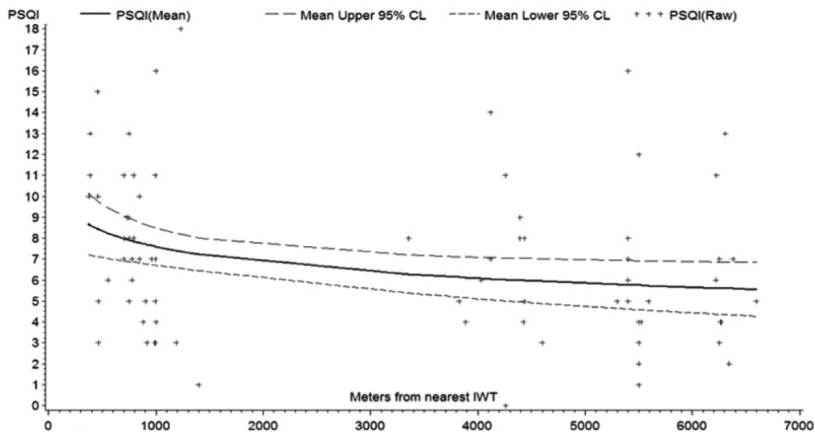


Fig. Modeled Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) versus distance to nearest IWT

The graph in this illustration shows the dependence of the sleep quality indicator on the distance to the nearest wind turbine or wind turbines farm (Figure).

Another important circumstance in the environmental impact of wind power devices is the large-scale occupation of natural space. This problem has several components, which will be reviewed below.

The greatest concern of ecologists is caused by injury and death of birds getting into the rotating blades of the wind turbine. This problem was discovered when large groups of wind turbines started operating - it is almost impossible for birds flying at the level of the rotating blades to foresee a collision with the rotating blades. Studies show that in the United States, the country that ranks second in the world in the amount of energy produced with the help of wind turbines, approximately 150 thousand birds die every year from collisions with WECs [3].

To solve this important problem, an original solution was recently proposed and implemented on some wind turbine farms - the use of visual control over the territory occupied by IWTs farms and its subsequent instant analysis by artificial intelligence. This makes it possible to timely stop the operation of some wind turbines that are potentially dangerous at a given time for a flying flock of birds or one single bird.

Visual pollution is momentous, associated in most cases with the need of installing large wind turbines on high towers, moreover, on wide flat surfaces (due to the increased wind speed in such areas). This problem is important not only because people living nearby wind turbine groups complain about the negative impact of such a picture on their psyche, due to the creation of a technogenic landscape by farms, but also because many of the same high towers can often disorient animals passing among them.

The unwanted impact on human health can be caused by the stroboscopic effect of shadow flickering when the blades of a wind turbine rotate, which, under certain conditions, leads to an epileptic seizure, although the likelihood of such conditions occurring is estimated as 1 chance in 10,000,000 [4]. Nevertheless, during the development of the HAWTs, to eliminate this impact, flickering zones of different frequency and intensity are modelled, and the result is considered when determining the locations of the WEC installation. Flares from the glare of the sun on the blades are excluded these days since a special matte coating is used on the blades.

The complication of handling wind turbines that have expired their service life is becoming increasingly important. As already noted, for the manufacture of IWT's blades, materials with a complex chemical composition are used, which causes great difficulties for the disposal of the blades that have gone out of service life. Nowadays, a simple solution of the burial of spent blades is being used, but this brings enormous harm to the Earth's lithosphere. The mass of the blades of HAWTs is approximately 12.39 tons per 1 MW of power, and for turbines that will become unusable in the next few years, it is equal to 8.34 tons per 1 MW [5]. It comes out, according to the calculated forecasts that in 2030 – more than half a million tons will be required to be buried. This confirms the relevance of the task of introducing blades from a new, more environmentally friendly type of material, which will make it possible to produce less unfavorable and expensive disposal.

All the above factors of the negative impact of WEC on the environment should be investigated in detail and their scale should be as-

sessed. This is necessary for the development of technologies and solutions to minimize the harm from wind generation. At the same time, the environmental advantages of this type of generators in comparison with fuel energy seem to us indisputable.

References

1. Bezrukikh P.P. Efficiency of renewable energy. Myths and facts // Vestnik agrarnoy nauki Dona. – 2015. – № 29.
2. Nissenbaum M.A., Aramini J.J., Hanning C.D. Effects of industrial wind turbine noise on sleep and health // Noise Health. – 2012 Sep-Oct. – Vol. 14 (60). – P. 237–243.
3. Effect of wind turbines on bird abundance: A national scale analysis based on fixed effects models / Ruiqing Miao, Prasenjit N. Ghosh, Madhu Khanna, Weiwei Wang and Jian Rong // Energy Science. – 2019 September.
4. Wind turbines and health: a review with suggested recommendations / Simos, Jean & Cantoreggi, Nicola & Christie, Derek & Forbat, Julien. – 2019.
5. Ratner S.V. Environmental and economic aspects of disposal solar panels and wind turbines. – Izd-vo South-Russian State Polytechnic University (NPI) 2020. – P. 69–74.

About authors

Molokov Leonid Konstantinovich – Bachelor's Student, Department of Information Technologies and Engineering Automation, Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, e-mail: molokov.leonid@bk.ru.

Rukavishnikova Irina Vladimirovna – Candidate of Science (Chemistry), Associate Professor, Department of Economics of Environmental Management, Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, e-mail: i.v.rukavishnikova@urfu.ru.

V.K. Savelieva, L.S. Pan

STUDY OF MODIFICATION OF THE SURFACE OF SEAWEED WITH CARBOXYLIC ACIDS IN ORDER TO OBTAIN BIOSORBENTS FOR SORPTION OF CESIUM FROM AQUEOUS SOLUTIONS

The need to create new materials, both for the purification of water resources and for the protection of living organisms and humans, is urgent and important due to the increasing pollution of the environment, including radioactive elements. In this work, we studied how the modification of the surface of seaweed such as *Cystoseira barbata* with carboxylic acids affects the enhancement of the immobilization of the ferrocyanide phase in the composition of the biosorbent. The introduction of functional groups on the surface of an alga during layer-by-layer assembly of iron ferrocyanide inside the support matrix was considered by IR spectroscopy on a Nicolet-380 device. It is shown that the maximum immobilization of iron ferrocyanide and a decrease in the leaching of the active phase during washing is achieved when the surface is functionalized with carboxylic acids.

Keywords: seaweed, biosorbent, iron ferrocyanide, cesium, surface modification, IR spectroscopy, carboxylic acids.

With the development of thermonuclear technologies and the testing of nuclear weapons, environmental pollution by technogenic nuclides has become a worldwide problem. Usually, radioactive material falls out near the explosion site. Some of it lingers in the troposphere, is picked up by the wind, gets into water bodies and quickly moves over long distances. The other part is thrown into the stratosphere at an altitude of over 10 km, where radioisotopes can be for many months, slowly scattering over the entire surface of the globe. According to S. Avery, the sources of radioactive cesium release into the environment can be divided into three main groups: (1) nuclear weapon testing, (2) accidental release, (3) continuous controlled release of radioactive cesium from nuclear reactors and nuclear fuel reprocessing plants. The half-life known for cesium-137 does not mean that after 30 years this radioisotope becomes radiation-safe. According to A.V. Yablokov, only after 10 half-life periods, the radiation hazard decreases to a practically non-hazardous (more than 1000 times) level, but even then it does not disappear completely.

Currently, various methods are proposed for the extraction of cesium ions from solutions, including from liquid radioactive waste [1, 2].

Currently known inorganic sorbents based on transition metal ferrocyanides have a high sorption capacity and selectivity with respect to cesium ions. The disadvantage of these sorbents is that they cannot be used for the purification of drinking water and food products, as well as for radiochemical contamination of animals and humans. In this regard, it is important to obtain biosorbents based on non-toxic natural carriers, which in their sorption properties would approach the known inorganic sorbents.

In this work, non-toxic seaweed, which are able to efficiently absorb metal ions from aqueous solutions, were used as a carrier. The possibility of obtaining a selective sorbent based on seaweed of the *Cystoseira barbata* type and ferrocyanide iron (FOC-Fe (III)), which is the main component of the medical preparation "Ferrocin", by treatment with chemical agents leading to the modification of the algae cell wall is considered. For this, the surface of seaweed was functionalized by treatment with solutions of carboxylic acids: acetic, glutamic, aspartic, glycine, cystine in order to enhance the immobilization and binding strength of iron ferrocyanide. The fixation of carboxyl groups on the surface is confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy. IR spectra of sorbent samples were recorded on a Nicolet 380 FT-IR spectrometer in the frequency range $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$. Samples for recording spectra were prepared by pressing KBr pellets. It consists in thoroughly mixing a finely ground sample with KBr powder, followed by pressing the mixture in a mold.

Figure shows the IR spectrum of algae after surface modification with a glycine solution. According to [4], salts of carboxylic acids are characterized by stretching vibration bands $\nu\text{C} = \text{Oac} = 1540\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$, $\nu\text{C} = \text{Axim} = 1360\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$. Probably, the bands of the IR spectrum on curve 1 (see Figure) at 1618 cm^{-1} , 1420 cm^{-1} , and 1352 cm^{-1} refer to the above mentioned vibrations. In this case, the intensity of the 1420 cm^{-1} band decreased, and a new absorption band appeared in the 1739 cm^{-1} region, indicating the stretching vibrations of $\text{C} = \text{O}$ in carboxylic acids (see Figure, curve 1).

To introduce the ferrocyanide component into the matrix of algae preliminarily modified with acids, they were treated with a solution of $0.1\text{ Fe}(\text{NO}_3)_3$ for a day. The attachment of iron to the functionalized surface of the alga was confirmed by new peaks at 1584 cm^{-1} and 1413 cm^{-1} (see Figure, curve 2), indicating the interaction between iron ions and carboxyl groups.

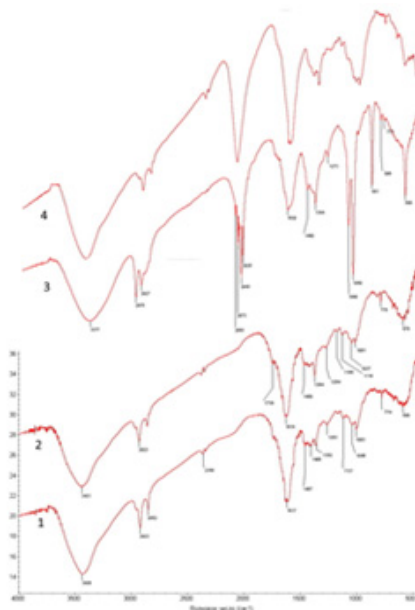


Fig. IR spectra of algae treated with glycine: 1 – treatment with glycine solution; 2 – treatment with $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ solution; 3 – treatment with $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ solution; 4 – treatment with $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ solution

Then, the iron-immobilized support material was separated from the solution, and the product was reacted with a 0.1 M $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ solution for 12 hours. The most obvious differences between the spectrum of modified algae and the spectrum of the obtained biosorbents with FOC-Fe is the presence of absorption bands characteristic of iron ferrocyanide: 2073 cm^{-1} , which characterizes stretching vibrations $\nu\text{C}\equiv\text{N}$; a band at 586 cm^{-1} indicating bending vibrations of FeCN ; 498 cm^{-1} , which characterizes the stretching vibrations of FeC (see Figure, curve 3), which indicates the successful formation of the active component in the sorbent. An increase in FOC-Fe (III) in the sorbent by layer-by-layer assembly includes an additional stage of adding a $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ solution after the completion of the two previous stages (see Figure, curve 4). It is known [2, 3] that a layered assembly unit can significantly reduce the leaching of FOC-Fe during flushing.

As a result of surface modification, the immobilization of iron ferrocyanide increased by 1.2 times and the separation of the

ferrocyanide phase during washing decreased. The maximum adsorption capacity and adsorption affinity were increased by modifying the seaweed surface with carboxylic acid solutions.

In the future, in order to increase the centers of the nucleus for the formation of ferrocyanide of iron and thus increase the content of the active phase in the composition of the biosorbent, it is planned to use functional groups on the surface of the seaweed. The main part of seaweed is the carbohydrate component ($> 75\%$); therefore, the fiber surface contains a large number of free hydroxyl groups, which can be converted into carboxyl groups by functionalization.

References

1. Science of The Total Environment / Hyowon Kim, Hyobin Wi, Sungwon Kang, Sunho Yoon, Sungjun Bae, Yuhoon Hwang // Prussian Blue Immobilized Cellulosic Filter for the Removal of Aqueous Cesium. – 2019. – Vol. 670, 20 June. – P. 779–788.
2. Chemically bound Prussian blue in sodium alginate hydrogel for enhanced removal of Cs ions / Eunbee Cho, Jongho Kim, Chan WooPark, Kune-WooLee, Taek SeungLee // Journal of Hazardous Materials. – 2018. – Vol. 360. – P. 243–249.
3. Surface modification of poly(vinyl alcohol) sponge by acrylic acid to immobilize Prussian blue for selective adsorption of aqueous cesium / Hyobin Wi, Hyowon Kim, Daemin Oh, Sungjun Bae, Yuhoon Hwang // Chemosphere. – 2019. – Vol. 226. – P. 173–182.
4. Smith A. Applied IR Spectroscopy. – M.: Mir, 1982. – 327 p.

About the authors

Savelieva Valeria Konstantinovna – Bachelor's Student, Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University; e-mail: valerasaveleva@gmail.com.

Pan Larisa Sergeevna – Candidate of Sciences in Chemistry, Associate Professor, Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University, e-mail: lara.pan1959@gmail.ru.

**A.S. Olkova, A.A. Balueva, D.A. Veretennikova, E.I. Ivashkina,
E.V. Bankovskaya, A.V. Kudinov, D.V. Pershin**

DIRECT-RUNNING PETROL FRACTIONS AS MEDICINES

The work investigated the wound-healing activity of ointment compositions that contain straight-run gasoline fractions. The group chemical composition of straight-run gasolines was determined by gas-adsorption chromatography. The nitrogen content of each fraction was determined using a Multi EA® 5000 with a chemiluminescence detector. KSSA-modeling was carried out using elements of correlation-regression analysis using Excel. Linear and nonlinear models of the dependence of wound healing activity on the content of nitrogen, paraffins, isoparaffins, naphthenes and arenes are proposed.

Keywords: straight-run gasoline, group chemical composition, correlation equation, wound healing activity.

Naftalan oil was used to treat diseases of the musculoskeletal system, skin (psoriasis, eczema, dermatitis), and vascular diseases. This type of oil differs from other oils in its composition, structure and medicinal properties [1]. Now the recoverable reserves of this deposit are almost depleted. Therefore, the search for new biologically active fractions of oil is an urgent task of pharmacology.

The purpose of this work is to assess the prospects for the use of straight-run gasoline fractions in veterinary medicine or medicine.

Object of research: straight-run gasoline from the AVT-5 unit of the LUKOIL-Permnefteorgsintez enterprise, which was separated in the laboratory by fractional distillation into five narrow fractions.

The chemical composition of each gasoline fraction was determined by gas-adsorption chromatography on an Agilent 7890B instrument. The chromatography results were processed using the DHA + software. The nitrogen content in each straight-run gasoline fraction was determined on a Multi EA® 5000 instrument with a chemiluminescence detector.

The results of the study of the group and elemental composition of all gasoline fractions are given in Table 1.

Table 1 shows that the AVT-5-150-176 fraction contains the largest number of arenes. Naphthenic hydrocarbons prevail in the AVT-5-95-122 and AVT-5-122-150 fractions, while paraffinic and isoparaffinic hydrocar-

bons prevail in the AVT-5-38-60 fraction. The highest content of nitrogen and oxygen is presented in the AVT-5-60-95 fraction.

Table 1

Results of determining the group hydrocarbon composition and nitrogen content in straight-run gasoline fractions

Fraction	Elemental composition (mg / l)	Group chemical composition (wt%)				
	Nitrogen (N)	Ca	Cn	Cp	Ci	Co
AVT-5	0.6	3.4	21.8	29.4	37.7	0.081
AVT-5-38-60	0.5	1.1	7.7	42.6	43.7	0.080
AVT-5-60-95	1.2	1.7	14.2	36.5	42.4	0.142
AVT-5-95-122	0.5	1.3	31.0	25.5	34.9	0.103
AVT-5-122-150	0.6	3.7	30.0	24.1	33.7	—
AVT-5-150-176	0.9	11.9	12.7	23.4	38.7	—

Where N – the nitrogen content, Ca – the concentration of arenes, Cn – the concentration of naphthenes, Cn – the concentration of paraffins, Ci – the concentration of isoparaffins, and Co – the concentration of oxygen-containing compounds.

The study of the wound healing activity (WHA) of ointment compositions containing 10 % gasoline fractions was carried out on white nonlinear rats [2] on the model of a linear aseptic skin wound [3].

The results of the study of the wound healing activity of straight-run gasoline fractions are presented in Table 2.

Table 2

Wound healing activity of ointment compositions based on straight-run gasoline fractions of oil

Object of study	Strength of rupture of the scar for 7 days, g	F	Object of study	Strength of rupture of the scar for 7 days, g
AVT-5	590.0±75.0*	—	Control	491.5±31.3
AVT-5-38-60	666.7±64.4*	–8.61	Base	613.8±61.4*
AVT-5-95-122	730.0±35.8**	–18.93	Levomekol	548.2±24.24*
AVT-5-122-150	615.0±33.1*	–0.19	Bepanten	645.2±34.9*
AVT-5-150-176	481.7±13.9**	21.52		

* – $p < 0,05$ compared control, ** – $p < 0,05$ compared base.

For a quantitative assessment of the effect of gasoline fractions, we used the F value – the change in rumen strength in comparison with the base.

According to the assessment results, the light fractions showed wound-healing activity, the ABT-95-122 fraction showed the maximum activity.

Table 2 shows that the ointment based on the AVT-95-122 fraction is superior in wound healing activity to the comparison drugs "Levomekol" and "Bepanten" by 33.0 and 13.0 %, respectively.

KSSA-modeling was carried out using elements of correlation-regression analysis using Excel. Linear and nonlinear models of the dependence of wound healing activity on the content of nitrogen, paraffins, isoparaffins, naphthenes and arenes ($n = 4$) are proposed. The resulting equations are presented in Table 3.

Table 3

Linear and nonlinear models of dependence
"chemical composition – activity"

№	Correlation equation	r	R^2
1	$F = 1,0015Cp^2 - 67,485Cp + 1048,7$	0.9778	0.9560
2	$F = -0,9134Ci^2 + 71,12Ci - 1370,9$	0.6387	0.4079
3	$F = -0,3592Cn^2 + 13,691Cn - 93,279$	0.9681	0.9372
4	$F = 0,2228Ca^2 + 6,2036Ca - 20,771$	0.9630	0.9273
5	$F = -158,58N^2 + 310,24N - 129,25$	0.9695	0.9399

In the course of this work, a qualitative and quantitative relationship between RPA and the chemical composition of gasoline fractions was revealed. Based on the studies carried out, the following conclusions: straight-run gasoline fractions exhibit high wound-healing activity, the greatest wound-healing effect was revealed in an ointment composition based on AVT-5-95-122 fractions, which is recommended for further in-depth studies. The results obtained can be successfully used in practice.

References

1. Muradov A.N. Synthesis of biologically active substances based on therapeutic Naftalan oil // Innovations in modern science. – 2014. – P. 169–173.
2. Biological activity of oil components / E.I. Ivashkina, G.E. Vankov, E.V. Bankovskaya, A.V. Kudinov // Chemistry. Ecology. Urban stud-

ies: materials of Vseros. scientific-practical conf. (with international participation), Perm, 23-24 Apr. 2020 / Perm. Nat. Research Polytechnic Un-t. – Perm: PNRPU Publishing House, 2020. – T. 2. – P. 79–83.

3. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs / ed. A.N. Mironova. – M.: Grif i K, 2012. – 944 p.

About the Authors

Olkova Alina Sergeevna – Student, Department of Chemical Technologies, Industrial Ecology and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University, e-mail: alinaolkova03@gmail.com.

Blueva Anna Andreevna – Student, Department of Chemical Technologies, Industrial Ecology and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University, e-mail: blueva278@gmail.com.

Veretennikova Daria Aleksandrovna – Student, Department of Chemical Technologies, Industrial Ecology and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University, e-mail: dashveretennikova@mail.ru.

Ivashkina Ekaterina Ivanovna – Student, Perm State Pharmaceutical Academy, e-mail: ekaterina.ivashkina@lenta.ru.

Bankovskaya Ekaterina Vladimirovna – Docent, PhD in Pharmacy, Department of Chemical Technologies, Perm National Research Polytechnic University, e-mail: albit2302@mail.ru.

Kudinov Andrey Viktorovich – Senior Lecturer, Department of Chemical Technologies, Perm National Research Polytechnic University, e-mail: kav_ttum@mail.ru.

Pershin Daniel Vladimirovich – Assistant, Department of Chemical Technologies, Perm National Research Polytechnic University, e-mail: daniel-pershin@mail.ru.

A.G. Bortnik, A.V. Botin, N.A. Medvedeva, S.U. Balandina

THE STUDY OF CHANGES IN THE MECHANICAL PROPERTIES OF STEEL UNDER THE INFLUENCE OF MICROMYCETE CORROSION

This article discusses the effect of various micromycetes on the corrosion of steel of two grades. Micromycetes of the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Trichoderma* were isolated from soil and water samples taken in the Perm Territory. Deterioration of the mechanical properties of steel and significant structural changes in its surface is revealed.

Keywords: biological corrosion, micromycetic corrosion, micromycetes, steel, ultimate tensile strength, fracture surface.

Introduction

At the moment, more and more attention is paid to the processes occurring at the junction of science. One of these processes is biological corrosion. One of the biggest problems in this area is the small amount of research devoted to this problem. It should be noted that this type of corrosion is one of the most destructive. Studies have shown [1] that up to 65-70 % of the applied metal structures do not have sufficient resistance to microorganisms and up to 50 % of corrosion processes are associated precisely with microbiological activity. The aggressive effect of bacteria (sulfate-reducing and thionic bacteria, iron bacteria) and filamentous fungi (micromycetes) in relation to metal structures is manifested both in aerobic and anaerobic conditions. Therefore, biocorrosive processes can be of bacterial, micromycete and mixed origin [2].

Biocorrosion agents of metal structures are mycoscopic fungi of the genus *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, sulfate-reducing bacteria (SRB) of the genus *Desulfovibrio*, thionic bacteria of the genus *Thiobacillus*, which oxidize sulfur and sulfur compounds to sulfuric acid; iron bacteria of the genus *Gallionella*, oxidizing ferrous iron to oxide [3]. Molds are corrosive to many non-ferrous and ferrous metals. For example, mass losses in the presence of *A. niger* when tested for 12 days reached 4 g/m² for aluminum, 18 g/m² for copper, and 33 g/m² for iron, which is 4 times higher than the losses during conventional corrosion [4].

In connection with all the above factors, it is first of all important to determine the nature of the effect of micromycetes on the metal in order to establish an effective method of protection.

Methodology

The effect of micromycetes on steel corrosion was investigated using the method of studying fungal resistance, the technique of which is described in detail in [5]. For the study, isolated pure cultures of microscopic fungi (*Aspergillus pss.*, *Penicillium pss.*, *Trichoderma pss.*). We used soil and water samples contaminated with oil products. These samples were taken in the city of Perm, which corresponds to the microorganisms of the soil in which the network of regional oil pipelines is located, thereby confirming the importance of the work for the Perm Territory.

As samples, we used steel wires of two grades (in parentheses are the EU–EN/China – GB standards of equivalent steel composition): U7A (DC01/ML08) and 08kp (CT70/T7).

Steel samples infected with microscopic fungi were kept under thermostatic conditions (temperature (29 ± 2) °C) and relative humidity over 90 % for 8 days.

Mechanical tests were carried out using an universal machine. Investigation of the state of the surface of steel wire samples (microstructure and nature of destruction) before and after their contact with microscopic fungi was studied using a Hitachi S-3400N electron microscope with an attachment for energy-dispersive (micro-X-ray spectral) analysis.

Results

According to the data on the corrosion rate, we can say that in both cases, the corrosion rate prevails in the micromycete of the genus *Trichoderma pss.* On steel 08kp, the same value for the corrosion rate can also be observed in the sample exposed to *Aspergillus* contamination. This can be explained by its great destructive ability. Thus, a typical representative of this genus, *Aspergillus niger*, forms a micellar film up to 1 mm thick already for 3-4 days.

To establish the effect of micromycetes on mechanical properties, a series of experiments was carried out on a tensile testing machine. Tension curves for each type of steel before and after exposure to micromycetes on the 8th day are shown in the figures (Fig. 1).

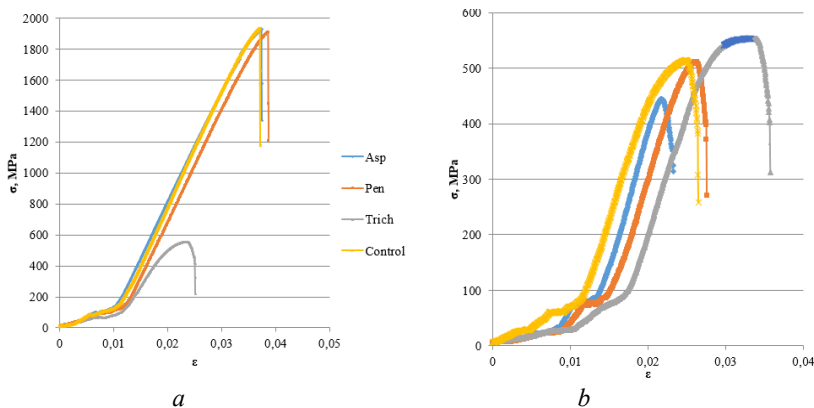


Fig. 1. Stretching curves: *a* – U7A, *b* – 08kp

It was found that micromycetes in most cases reduce the plasticity and strength of steel samples. An interesting picture can be seen when *Trichoderma pss.* acts on U7A steel. In this case, the micromycete not only increased its strength, but also increased its plasticity.

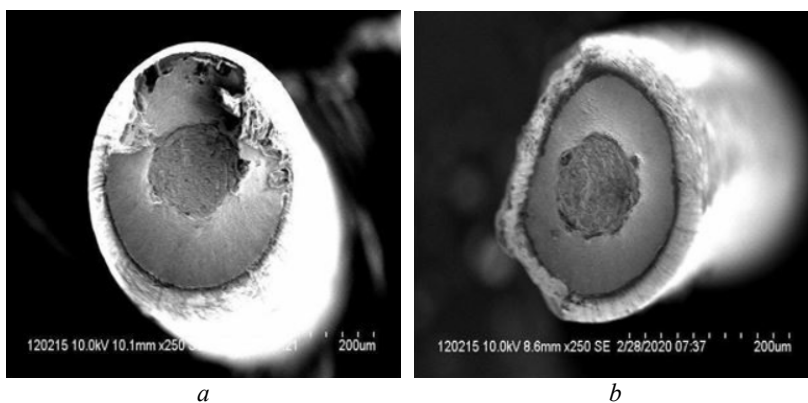


Fig. 2. The fracture structure of U7A steel after stretching on the 8 day:
a – without micromycete, *b* – *Aspergillus pss.*

This conclusion is consistent with the nature of destruction after corrosion tests. These results were evaluated by photomicrographs of wire ends after mechanical tensile tests. All samples are characterized

by brittle fracture. As an example, Fig. 2 shows the results for the original steel wires U7A and samples after exposure to microscopic fungi *Aspergillus pss*.

Thus, micromycetes of the genus *Trichoderma* are the most corrosive, which may be due to the deeper penetration of fungal hyphae into the steel structure, as a result of which destruction occurs from the inside. The obtained data are supposed to be used in the further development of methods and means of protection against biocorrosion and in the study of their effectiveness.

Conclusion

Based on the data obtained, several conclusions can be drawn. First, micromycetes significantly increase the corrosion rate even with a short exposure time. In addition, micromycetes have a strong effect on changing the physical properties of steel, such as strength. Most of them reduce the strength, but in rare cases, an increase in strength is possible, and in addition to this, an increase in plasticity, which is expressed in the appearance of viscosity on the stretching plot of the platform. The most corrosive micromycete can be called micromycetes of the genus *Trichoderma*, which may be associated with a deeper penetration of hyphae into the structure of metals, which causes deeper changes.

Funding: The reported study was funded by RFBR and Perm Territory, project number 20-43-596016.

References

1. Skovhus T.L., Enning D., Lee J.S. Microbiologically Influenced Corrosion in the Upstream Oil and Gas Industry // CRC Press. – 2017. – P. 559.
2. Widdel F. Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria // Biology of Anaerobic Microorganisms / ed. A.J.B. Zehnder, Wiley-Liss, John Wiley and Sons, Inc. – New York, 1988. – P. 469–586.
3. Microbiologically Influenced Corrosion / Brenda J. Little [et. al.]. – John Wiley & Sons, 2007. – 272 p.
4. O mekhanizme mikrobiologicheskoy korrozii stalej neftepromyslovogo oborudovaniya v usloviyah ekspluatsii i v laboratorii / E.A. Borisenkova [i dr.] // Vestnik SGTU. –2013. – Vol. 3 (39). – P. 99–104.

5. O vozmozhnosti vliyaniya mikromicetov na korrozionnoe povedenie uglirodistoj stali / N.A. Medvedeva, S.Y. Balandina, A.G. Bortnik, M.D. Plotnikova, N.Y. Lisovenko // Vestnik Permskogo Universiteta. – 2020. – №1 (10). – P. 84–93.

About the authors

Bortnik Alisa Georgievna – Master of Physics Chemistry, Perm State University, e-mail: oscurasangre@gmail.com.

Botin Alexandr Valeryevich – 3rd year Undergraduate Student, Perm State University, raphunihhh@gmail.com.

Medvedeva Natalya Alexandrovna – Candidate of Science in Chemistry, Perm State University, e-mail: nata-kladova@yandex.ru.

Balandina Svetlana Yurievna – Head of Laboratory "Bactericide", Department of Pharmacology and Pharmacy, Perm State University, e-mail: bactericid@yandex.ru.

D.A. Kochergina, N.Yu. Lyubimova, T.A. Gertsen

INERTIA MOMENTS OF THE MOLECULES IN THE COURSE OF PHYSICS FOR STUDENTS OF CHEMICAL FIELDS

Annotation: the article describes the importance for students of the study of interdisciplinary issues. Such an interdisciplinary issue as the moment of inertia was considered. The moment of inertia is a quantitative measure of the inertia of a body during its rotational motion, which determines the rotational component of the energy of molecules. The moment of inertia shows in spectroscopy, which is a method for determining the composition of a substance, its structure and properties. On the basis of the article, it is possible to identify the importance for students of biotechnology of such an interdisciplinary issue as the moment of inertia.

Keywords: molecular structure, moment of inertia, spectroscopy, rotational motion.

The paper deals with the organization and results of professionally-oriented research of students in the field of "Biotechnology" (19.03.01). First-year students always ask questions about the role of studying non-chemical disciplines (even physics courses) in their future practice. Unfortunately, there is a clear lack of practical and laboratory training. Our goal is to bridge the gap between the study of physical laws and the practical orientation of the training of students-biotechnologists.

Real interdisciplinary issues make meaningful the study of physical laws and their practical significance, show the need for competent processing of measurement results, the use of mathematics, computer technology. In addition, students have the opportunity to work both individually, and in a group, to present their results, to search for information using domestic and foreign literature and electronic resources. Currently, there is an active development of interdisciplinary approaches to the preparation of bachelors and masters. Not only scientific relationships are discussed, but also ways to include them in educational programs. The most difficult and "non-chemical" section of the physics course is considered by students to be mechanics. Therefore, as one of the many examples from the physics course, we have considered in detail the term "moment of inertia" related to the dynamics of rotational motion. At first glance, it seems that this mechanical term has absolutely nothing to do with chemistry.

The moment of inertia, in physics, is a quantitative measure of the inertia of a body during its rotational motion, that is, the opposite that a body exhibits to the fact that its speed of rotation around the axis is changed by the application of a torque (the force of rotation). The moments of inertia of various symmetric bodies are calculated and measured by students in practical and laboratory classes in physics. An example of the plane geometric structure of a molecule is shown in the figure.

Models of molecules can also be represented in the form of geometric "structures", different symmetries and calculate their moments of inertia as educational tasks in physics classes¹. For example, the simplest model of a rotating molecule is a rigid rotator (diatomic molecules), linear triatomic molecules (CO_2 , C_2H_2 ...) (Figure).

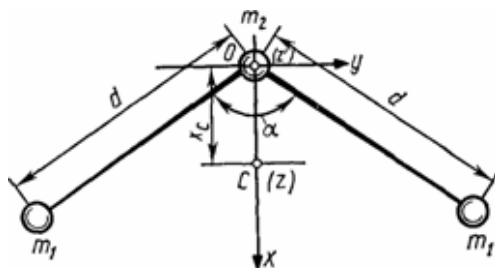


Fig. Nonlinear triatomic molecule [1]

The values of the moments of inertia of bodies, including molecules, determine the rotational component of the energy of the molecules.

Then the question arises: and in what phenomena, processes do the moment of inertia manifest itself?

As is known, spectroscopy is a universal method for determining the qualitative and quantitative composition of a substance, its structure and properties under various external conditions. Optical spectroscopy studies the spectra in the wavelength range of 0.01-1000 microns. According to the objects studied, optical spectroscopy is divided into atomic and molecular. Atomic spectroscopy methods are used to determine the elements that make up a substance. In this case, the substance itself must be decomposed to atoms. The spectra of molecules contain infor-

¹ Chertov A.G., Vorobyov A.A. Problem Book in Physics. Textbook for universities. M.: Alliance. 2019. 640 p.

mation not only about the elemental composition of a substance, but also about how these elements are connected to each other in a molecule.

The total energy of the molecule E can be roughly divided into three independent types of energy: 1) E_g - the energy of rotation of the molecule as a whole around the axis passing through the center of mass perpendicular to the line connecting the nuclei, 2) E_v - the energy of vibration of the nuclei of the atoms that make up the molecule near their equilibrium position, and 3) E_e - the energy of the electron shell of the molecule. The moments of inertia of molecules that are electric dipoles can be determined from spectroscopic data, in particular from the fine structure of the infrared spectrum and the Raman spectrum.

In the section of the physics course "Electricity", you can again refer to these concepts: dipole, moment of inertia, energy, etc. When, studying the section "Optics, the structure of the atom", you should once again pay attention to them, already taking into account the quantization of quantities.

Thus, using the examples of ordinary educational tasks in physics, you can build a connection with the disciplines of chemical directions.

About the authors

Kochergina Daria Andreevna – Student, Perm National Research University, e-mail: kocdas@yandex.ru.

Lyubimova Nina Yuryevna – Senior Lecturer, Department of Applied Physics, Perm National Research University, e-mail: ninalubimova@yandex.ru.

Gertsen Tatyana Anatolievna – Professor, Department of Applied Physics, Perm National Research University.

M.I. Sidelnikov

RESEARCH OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS ABILITY TO DIFFUSE THROUGH THE GASTROINTESTINAL TRACT WALL USING PARALLEL ARTIFICIAL MEMBRANES

This article is devoted to performing the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA), which allows to assess the bioavailability of biologically active substances *in vitro*, using ketoprofen and ranitidine as test compounds. The possibility of replacing expensive components (buffer and lipid solutions), recommended by the developer, with simpler and more accessible phosphate buffer and phosphatidylcholine in dodecane in the analysis of diffusion capacity of substances in relation to the gastrointestinal tract was investigated. The obtained results for test compounds with known bioavailability and parameters in the PAMPA test during standard testing do not coincide in numerical values, but correspond, in terms of trend, to the tabular values.

Keywords: bioavailability, artificial membranes, gastrointestinal permeability, PAMPA, ketoprofen, ranitidine.

Evaluation of bioavailability of biologically active compounds represents one of the important tasks in the development of effective pharmaceuticals. Parallel artificial membrane permeability assay allows optimizing the drug discovery process by reducing the number of investigated substances at the stage of preclinical study. The main advantages of this method include the small amounts of substances required for analysis, as well as the high speed of obtaining the test results. PAMPA is an *in vitro* model of substances passive diffusion through the wall of the gastrointestinal tract (GIT). The system consists of a pair of 96-well microplates [4], one of which acts as a donor compartment and the other one as an acceptor compartment. In general, the analysis consists of following steps: a lipid composition in a suitable solvent is applied to a porous membrane of the acceptor (upper) compartment. The donor (lower) compartment is filled with solutions of compounds, the diffusion capacity of which must be investigated. The pH of the solutions varies in the range corresponding to the acidity of different parts of the gastrointestinal tract. The acceptor compartment is filled with a buffer that simulates blood plasma. The assembled system is placed for a certain time in a thermostat (pION Gut-Box) without stirring or with con-

stant stirring and a given thickness of the aqueous boundary layer. After the lapse of time, the concentrations of the substance in the donor and acceptor compartments are compared with the one in the reference plate (via UV spectra of solutions) and the value of logPe is calculated. LogPe value stands for the effective membrane permeability referring to this substance [1]. Varying the composition of the buffer solutions in the donor and acceptor compartments of the "sandwich", as well as the composition of the model lipid layer, leads to different values of Pe. We used simple and accessible components - phosphate buffer and 1 % solution of phosphatidylcholine in dodecane. The experiments were carried out for the known drugs ketoprofen and ranitidine.

For each substance, the analysis was carried out at pH = 7.4 and at pH = 6. The incubation was held for 1 hour. The calculation of the effective membrane permeability was performed automatically in the Pampa Explorer software associated with the method. The optical density was measured in a Tecan Infinite M1000 microplate reader.

Although the obtained numerical values logPe for the investigated substances do not coincide with the tabulated ones obtained under standard conditions [2, 3], the general trends persist. Thus, ranitidine practically does not diffuse through the gastrointestinal tract wall (Fig. 1-4), which is consistent with experimental data *in vivo* as well as standard PAMPA data. Ketoprofen diffuses better at pH = 6, which is explained by the acidic character of the molecule: ionized at pH = 7,4 they do not permeate lipid membrane effectively.

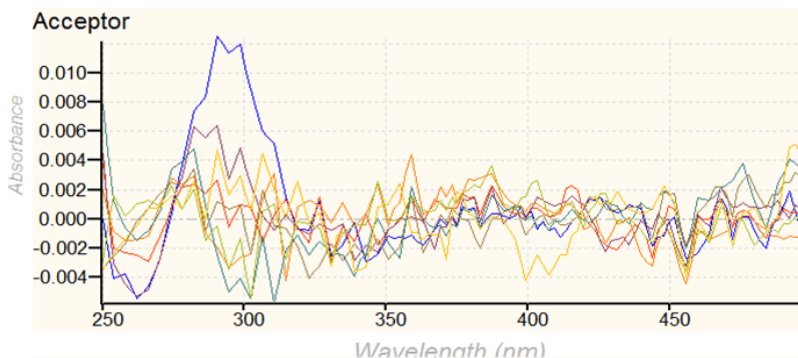


Fig. 1. Absorbance spectrum of ranitidine in the acceptor compartment

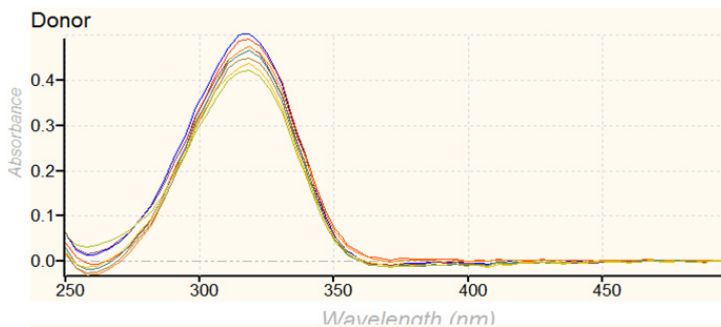


Fig. 2. Absorbance spectrum of ranitidine in the donor compartment

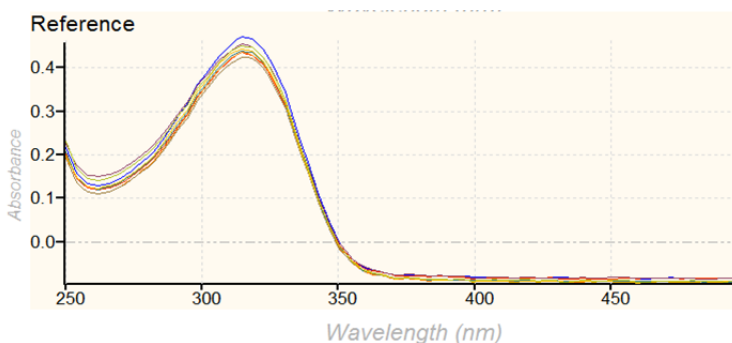


Fig. 3. Absorbance spectrum of ranitidine in the reference plate

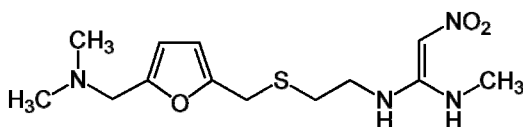


Fig. 4. The structure of ranitidine

The experimental results correspond to the objective data on the diffusion capacity of the analyzed substances. This fact indicates that a simple system for determining bioavailability using a 1 % solution of phosphatidylcholine in dodecane and sodium phosphate buffer may be applied and the components we have chosen for analysis can in certain cases replace the more expensive ones recommended by the developer company. To establish the complete reliability and versatility of the

method, additional research will be carried out in relation to other groups of biologically active substances, and, probably, changes in the composition of the buffer and/or lipid solutions will be made.

References

1. Григорьева Т.А., Гарабаджиу А.В., Трибулович В.Г. Исследование *in vitro* мембранотропных свойств биологически активных соединений // Известия СПбГТИ(ТУ). – 2016. – № 33. – С. 42.
2. Compound Summary – Ketoprofen. – 2021. – URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ketoprofen#section=LogP> (accessed 10 March 2021).
3. Compound Summary – Ranitidine, 2021. – URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3001055#section=LogP> (accessed 10 March 2021).
4. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA), 2021. – URL: [https://www.cypotex.com/admepk/in-vitro-permeability/pampa#:~:text=PAMPA%20\(parallel%20artificial%20membrane%20permeation,hour%20incubation%20at%20room%20temperature](https://www.cypotex.com/admepk/in-vitro-permeability/pampa#:~:text=PAMPA%20(parallel%20artificial%20membrane%20permeation,hour%20incubation%20at%20room%20temperature) (accessed 7 March 2021).

About the authors

Sidelnikov Mikhail Igorevich – Bachelor Student, Perm National Research Polytechnic University, e-mail: msidelnikov.g59@yandex.ru.

Scientific supervisor – Krasnykh Olga Petrovna – Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor, Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University.

Научное издание

ХИМИЯ. ЭКОЛОГИЯ. УРБАНИСТИКА

*Материалы
всероссийской научно-практической конференции
(с международным участием)*

Том 2

г. Пермь, 22–23 апреля 2021 г.

Корректор *Е.Б. Денисова*

Подписано в печать 31.05.2021. Формат 60×90/16.
Усл. печ. л. 15,8. Тираж 25 экз. Заказ № 90/2021.

Отпечатано в типографии ООО «Цифровые решения»
г. Пермь, ул. Т. Барамзиной, 42/3