

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

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

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

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru, vorobyev095@yandex.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василев* 4

Оригинальные статьи

Физико-химическая трансформация компонентного состава продуктов пищевого назначения под воздействием высокоэнергетического излучения.

А.В. Куликовский, Н.Л. Вострикова, В.С. Болдырев, Г.Н. Фадеев, А.Н. Иванкин, В.А. Беляков 5

Математическое обоснование оптимального роста *Trichoderma atroviride* на питательной среде с различными углеводными компонентами.

И.А. Гнеушева, А.В. Лушников, Н.Е. Павловская, О.А. Маркина 13

Применение инновационного биосорбента на основе отходов лесопромышленного производства для очистки нефтезагрязненных вод.

Т.Н. Щемелинина, Ж.Т. Пантюхина, Д.В. Тарабукин, Е.М. Анчугова, В.В. Володин 19

Изучение физико-химических и специфических свойств гиалуронидазы из семенников крупного рогатого скота.

Я.В. Мельникова, Н.В. Глазова 25

Выделение фагов и штаммов холерных вибрионов из поверхностных водоемов и стоков в ходе проведения мониторинга на территории г. Ростова-на-Дону с 2008 г. по 2017 г.

В.Д. Кругликов, Н.Е. Гаевская, Д.А. Левченко, С.В. Титова, И.В. Архангельская, А.В. Тюрина, М.В. Ренгач 35

Структура комплекса актиномицетов и активность микробиологических процессов в почвах Монголии.

Ж. Норовсурэн 41

Применение гелевых электродов для изучения биотопливных элементов на основе фермента глюкозооксидазы.

М.В. Вишневская, Д.А. Газизова, Г.У. Бадранова, П.М. Готовцев, Р.Г. Василев 45

Разработка питательной среды на основе гидролизата фибрина для культивирования клеточных культур Vero и ВНК-21 и репродукции вируса бешенства.

С.В. Генералов, И.М. Жулидов, М.В. Антонычева, К.И. Холматов, Ю.К. Гаврилова, Е.Г. Абрамова, А.Д. Белоусов, Е.А. Усачев 50

Обзоры

Лиофилизация живых вакцин.

А.В. Комиссаров, Д.Н. Бибииков, О.А. Волох, С.А. Бадарин, Н.В. Сеницына, Н.И. Костылева, В.Г. Германчук, А.К. Никифоров 56

Страницы истории

К 100-летию со дня рождения Фредерика Сенгера — великого химика XX столетия.

В.С. Воробьев 74

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Physico-chemical transformation of the component composition of food products under the influence of high-energy radiation.

A.V. Kulikovskii, N.L. Vostrikova, V.S. Boldyrev, G.N. Fadeev, A.N. Ivankin, V.A. Belyakov 5

Mathematical justification for optimal growth of *Trichoderma atrobrunneum* on a nutrient medium with various carbohydrate components.

I.A. Gneusheva, A.V. Lushnikov, N.E. Pavlovskaya, O.A. Markina 13

Application of innovative biosorbent based on pulp and paper industry wastes for the purification of the oil-polluted waters.

T.N. Shchemelinina, Zh.L. Pantyuhina, D.V. Tarabukin, E.M. Anchugova, V.V. Volodin 19

The study of physico-chemical and specific properties of hyaluronidase from the testes of cattle.

I.V. Melnikova, N.V. Glazova 25

Isolation of phages and strains of *Vibrio cholerae* from surface water bodies and drains during the monitoring on the territory of Rostov-on-Don from 2008 to 2017.

V.D. Kruglikov, N.Ye. Gayevskaya, D.A. Levchenko, S.V. Titova, I.V. Arkhangel'skaya, A.V. Tyurina, M.V. Rengach 35

The structure of the complex of actinomycetes and the activity of microbiological processes in the soils of Mongolia.

J. Norovsuren 41

The use of gel electrodes for the study of biofuel cells based on the enzyme glucose oxidase.

M.V. Vishnevskaya, D.A. Gazizova, G.U. Badranova, P.M. Gotovtsev, R.G. Vasilov 45

Development of a culture medium based on fibrin hydrolyzate for the cultivation of Vero and BHK-21 cell cultures and reproduction of the rabies virus.

S.V. Generalov, I.M. Zhulidov, M.V. Antonycheva, K.I. Kholmatov, Yu.K. Gavrilova, E.G. Abramova, A.D. Belousov, E.A. Usachev 50

Reviews

Lyophilization of live vaccines.

A.V. Komissarov, D.N. Bibikov, O.A. Volokh, S.A. Badarin, N.V. Sinitsyna, N.I. Kostyleva, V.G. Germanchuk, A.K. Nikiforov 56

Pages of history

To the 100th anniversary of the birth of Frederick Sanger — a great chemist of the 20th century.

V.S. Vorobyev 74

Rules for authors 78

К читателям

В номере 3 за 2018 год собраны многоплановые работы, отражающие разнообразные интересы исследователей. Куликовский А.В. с коллегами из ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН и МГТУ им. Н.Э. Баумана изложили результаты изучения физико-химической трансформации компонентного состава продуктов пищевого назначения под воздействием высокоэнергетического излучения.

Гнеушева И.А. и др. (Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина) представили математическое обоснование оптимального роста *Trichoderma atroviride* на питательной среде с различными углеводными компонентами.

Группой сотрудников Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН (Щемелинина Т.Н. и др.) исследована возможность использования модифицированного обезвоженного осадка активного ила в качестве носителя для получения инновационного биосорбента для нефтезагрязненных сред, где биологическим агентом является иммобилизованный на нем консорциум микроорганизмов-деструкторов.

Мельникова Я.В., Глазова Н.В. (Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия) провели анализ физико-химических свойств и специфичности гиалуронидазы из семенников крупного рогатого скота с различной степенью очистки. Показано увеличение специфичности фермента и лекарственного препарата по сравнению с его специфичностью в экстракте.

Кругликов В.Д. с коллегами из Ростовского-на-Дону противочумного института осуществили мониторинг фагов и штаммов холерных вибрионов из поверхностных водоемов и стоков на территории г. Ростова-на-Дону с 2008 по 2017 гг., что имеет большое прогностическое и лечебно-профилактическое значение.

Норовсүрэн Ж. из Института общей и экспериментальной биологии Академии наук Монголии (Улан-Батор) исследовала структуру комплекса актиноциетов и активность микробиологических процессов в пустынно-степных почвах Монголии.

Вишневская М.В. и др. (НИЦ «Курчатовский институт», Московский физико-технический институт) оценили эффективность применения гелевых электродов для изучения биотопливных элементов на основе фермента глюкозооксидазы.

Авторский коллектив из Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов (Генералов С.В. и др.) разработал питательную среду на основе гидролизата фибрина для культивирования клеточных культур Vero и ВНК-21 и репродукции вируса бешенства.

Работниками этого же саратовского учреждения в сотрудничестве с Саратовским государственным аграрным университетом имени Н.И. Вавилова (Комиссаров А.В. и др.) представлен обстоятельный обзор отечественной и зарубежной литературы по проблеме лиофилизации живых вакцин.

Наконец, в исторической рубрике помещен материал к 100-летию со дня рождения Фредерика Сенгера. Журнал постоянно откликался на юбилейные даты, связанные с именем этого беспрецедентно знаменитого ученого, и поэтому не мог обойти и данный исторический рубеж и подготовил соответствующую информацию.

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

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ПРОДУКТОВ ПИЩЕВОГО НАЗНАЧЕНИЯ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ВЫСОКОЭНЕРГОЕМКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

А.В. КУЛИКОВСКИЙ^{1*}, Н.Л. ВОСТРИКОВА¹, В.С. БОЛДЫРЕВ², Г.Н. ФАДЕЕВ²,
А.Н. ИВАНКИН², В.А. БЕЛЯКОВ²

¹ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН,

²МГТУ им. Н.Э. Баумана, Москва

Методом хромато-масс-спектрометрии изучены некоторые аспекты образования и трансформации органических веществ в пищевых системах на основе сырья животного происхождения, протекающих под воздействием радиационного облучения с дозой 1–6 кГр. В качестве объектов исследования использовали модельные смеси животного сырья и пищевой продукции на его основе. Исследования показали, что применяемое радиационное γ -облучение, позволяющее увеличивать сроки хранения, приводит к изменениям химического состава важнейших компонентов, способствуя радиационно-химическому превращению химических веществ. Показано, что в облученных образцах происходила миграция двойных химических связей непредельных жирных кислот, наблюдалось образование некоторого количества изомеров жирных кислот типа 12-метилтридеcanoата, 11-тетрадеcanoата, констатировалось образование отсутствовавших в начальных образцах производных акролеина, антрацена. В продуктах облучения наблюдались другие ароматические соединения, которые отсутствовали в необлученном сырье. Установлено, что даже при низких дозах облучения 1 кГр в облученной продукции осуществлялась трансформация природных аминокислот, в частности, увеличивалось содержание оксипролина, росла массовая доля свободных аминокислот с уровня 0,05–0,2 до 0,3–0,7%. Сделан вывод о том, что применяемое для микробиологического обеззараживания пищевых систем радиационное облучение приводит к изменениям химического состава продуктов, которые могут влиять как на вкусо-ароматические характеристики, так и на безопасность пищевой продукции в целом.

Ключевые слова: радиационное облучение, химический состав продукции пищевого назначения.

Введение

Развитие технических устройств, обеспечивающих возможность применения энергофизического воздействия на используемые человеком материалы, позволяет сегодня осуществлять физико-химические превращения с достаточно высокой эффективностью. Применяют кавитацию, СВЧ, акустическое воздействие [2, 13]. Наиболее значимым с точки зрения скорости достижения конечного результата является радиационное облучение, которое сегодня применяется в химии, биотехнологии, медицине и пищевой индустрии [3, 23].

Относительно доступными источниками ионизирующей радиации являются, прежде всего, γ -облучение

с помощью радиоактивного изотопа ^{60}Co с энергией 1,3 МэВ, а также облучение рентгеновскими лучами на установках с энергией 5 МэВ и воздействие потоком электронов на электронных ускорителях с энергией порядка 10 МэВ [4, 12, 17].

Быстрота достижения конечного эффекта обуславливает непрекращающиеся попытки использовать радиационное облучение в индустрии пищевых систем [23].

Применение радиации обусловлено, в первую очередь, тем, что облучение пищевого сырья и продукции на его основе обеспечивает уничтожение микроорганизмов, оказывая псевдостерилизующий эффект. Это увеличивает сроки хранения облученной продукции. Однако радиация обладает отрицательным свойством воздействовать на сырье и продукты, вызывая химические превращения по механизму радиолитиза [4, 14, 20, 22].

Многочисленными исследованиями показано, что радиация вызывает радиолитиз природных компонентов, которые могут использоваться в пищевой индустрии [3, 20, 22].

© 2018 г. Куликовский А.В., Вострикова Н.Л., Болдырев В.С., Фадеев Г.Н., Иванкин А.Н., Беляков В.А.

* **Автор для переписки:**

Куликовский Андрей Владимирович

канд. тех. наук, доцент, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

E-mail: kulikovsky87@gmail.com

Опасность результатов облучения обуславливает наличие строгого законодательного контроля процесса. Применительно к пищевым системам существуют нормативные документы, регламентирующие применение радиации. В Европейском союзе требования безопасности радиационно обработанных пищевых продуктов изложены в Стандарте 106-1983, Rev.1-2003 и Директиве Европейского совета и парламента 1999/2/ЕС от 22.02.1999. По данным МАГАТЭ, в 69 странах действует разрешение на облучение более чем 80 видов пищевой продукции. В 40 странах, в первую очередь, в Китае и США проводится облучение пищевой продукции на постоянной основе [1, 9, 16].

В Советском Союзе с 1964–1967 гг. было разрешено ограниченное применение радиационного облучения. Действующие до настоящего времени нормы допускают подавление развития микроорганизмов для удлинения срока хранения полуфабрикатов, в частности, на основе мясного сырья с мощностью дозы 6–8 кГр.

Исследование результатов воздействия различных доз облучения показывает, что летальные дозы гамма-облучения для разных микроорганизмов различаются существенно. Так, летальная доза в кГр при комнатной температуре составляет: для *Salmonella typhimurium* – 3, *E. coli*, *Str. faecalis*, *Shig. dysenteriae* – 6, *Mycobac. tuberculosis* – 10, *Sarcina lutea*, *Bac. pumilus* (споры) – 17, *Bac. subtilis* (споры), *Clostr. sporogenes* (споры), *Aspergillus niveus* – 20, *Clostr. botulinum* – 90 [3, 6, 8, 15]. То есть, для полного гарантированного обеззараживания продукции необходимы достаточно высокие дозы радиационного облучения.

Высокие дозы облучения приводят к образованию новых компонентов в облучаемых объектах [7, 18]. Так, в частности, из-за высокого содержания жиров в облученных дозой до 10 кГр продуктах часто обнаруживается 2-алкилциклобутанон – вещество, которое является продуктом радиохимической трансформации липидных компонентов. Это вещество изначально не содержится в сырье и может использоваться в качестве маркера сильного облучения пищевой продукции [9, 21].

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные радиационно-химическому воздействию, информация о систематической взаимосвязи мощностей доз облучения и компонентного состава пищевых систем, в особенности на основе животной ткани, в литературе практически отсутствует. Результаты такого воздействия могут сказываться отрицательно на качестве получаемой пищевой продукции. В связи с тем, что в подавляющем большинстве имеющихся сегодня продуктов содержится значительное количество липидных компонентов,

представляло интерес оценить основные изменения компонентного состава, происходящие при облучении на химическом уровне.

Цель настоящей работы – изучить изменения химических веществ в сырье и продукции пищевого назначения под воздействием радиационного облучения.

Материалы и методы

В качестве объектов исследований использовали сырье на основе животной ткани из длиннейших мышц *m. longissimus dorsi*, взятое из говядины и свинины, в смеси (25:75) с массовой долей жира 21,5%, белка 20,3%, а также выработанные из этого сырья по промышленной технологии вареные колбасные изделия – колбаса молочная. Использованная рецептура колбасного изделия включала в себя, кг: говядина – 0,5; свинина – 1,5; молоко коровье – 0,2; хлорид натрия – 0,1; сахароза – 0,15; яйцо – 0,1.

Облучение проводили на установке РХМ-у20 с источником γ -излучения ^{60}Co без применения нагревания.

Основные физико-химические показатели определяли по стандартным методикам, применяемым в анализе пищевых систем [10].

Наличие основных химических веществ в облученной продукции изучали методом хроматомасс-спектрометрии. Для этого навеску 1 г образца обрабатывали в течение 8 ч смесью 12 мл хлороформа с 10 мл метанола в присутствии 1%-ного раствора КСl для растворения химических компонентов, экстракт фильтровали через бумагу. 1 мл экстракта, содержащего около 0,1 г сухого остатка, смешивали с 5 мл 15%-ного раствора ацетилхлорида в метаноле, выдерживали в течение 2 ч при 100 °С в герметично запаянной стеклянной ампуле в атмосфере Ar и нейтрализовали добавлением насыщенного раствора KOH в CH₃OH до pH раствора 5,0–6,0. К смеси добавляли 3 мл насыщенного водного раствора NaCl и 6 мл гексана, оставляли на 30 мин и отбирали для анализа 0,5 мл из прозрачного гексанового слоя, содержащего метилированные и неметилированные формы анализируемых веществ. Условия хроматографирования на капиллярной колонке HP-5MS: газ-носитель – He, скорость потока – 1 мл/мин, температура инжектора в режиме без деления потока – 250 °С, начальная температура термостата колонки – 100 °С в течение 2 мин, программируемый нагрев – от 100 до 290 °С со скоростью 20 °С/мин, изотерма – при температуре 290 °С до 25 мин, время анализа компонентов – 25 мин, объем автоматически вводимой пробы – 1 мкл. Параметры идентификации: температура источников ионов – 230 °С, температура квадруполя –

150 °С, энергия электронов — 70 эВ, детектирование в режиме сканирования полного масс-спектра — в диапазоне масс 33–1050 а.е.м. Для расчета содержания веществ использовали автоматическую базу поиска и идентификации данных хромато-масс-спектрометрии NIST08 MS Library с вероятностью соотношения пиков более 65%. Результаты определения обрабатывали с использованием методов математической статистики.

Обсуждение

В таблице 1 представлены данные по изменению ключевых физико-химических показателей изучаемых объектов. В данной таблице содержатся основные показатели, применяемые в анализе продукции на базе животного сырья.

Выбранный диапазон облучения 1–6 кГр главным образом обеспечивает определенный уровень антимикробной обработки и поэтому представляет практический интерес.

Уровень приведенных в таблице 1 величин примерно соответствует обычно наблюдаемым значениям параметров при рутинном анализе образцов различного происхождения, не подвергавшихся облучению. То есть, по представленным данным, можно заключить, что облученная продукция в принципе мало отличается от продукции необлученной. Однако используемые показатели являются интегральными и не могут полностью подтверждать идентичность необлученной и гамма-облученной продукции.

Наблюдаемая тенденция к незначительному изменению пероксидного числа, азота свободных аминок групп и содержания летучих жирных кислот может свидетельствовать о происходящих радиохимических превращениях.

Представляло интерес, используя возможности современной хромато-масс-спектрометрии, оценить реальные изменения в составе главных компонентов, идентифицированных в изучаемых продуктах.

Таблица 1

Изменение основных физико-химических показателей мяса и мясных продуктов, подвергнутых γ -облучению (n=5)

| Наименование продукта | Доза облучения, кГр | pH | Влага, % | Кислотное число, мг КОН/г | Пероксидное число, ммоль акт. O ₂ /кг жира | Содержание летучих жирных кислот, мг КОН/25 г | Азот свободных аминок групп (аминоаммиачный азот), мг/100 г |
|--------------------------------------|---------------------|------|----------|---------------------------|---|---|---|
| Сырье на основе смеси животной ткани | 0 | 6,12 | 75,92 | 1,03 | 1,86 | 1,22 | 16,2 |
| | 3 | 6,11 | 75,69 | 1,34 | 1,05 | 1,68 | 15,9 |
| | 6 | 6,11 | 75,55 | 1,41 | 1,13 | 1,89 | 15,7 |
| Продукт (колбасное изделие) | 0 | 6,74 | 68,29 | 1,23 | 3,03 | 32,24 | 32,3 |
| | 1 | 6,73 | 68,41 | 1,31 | 2,86 | 37,55 | 25,6 |
| | 2 | 6,75 | 68,30 | 1,42 | 3,24 | 36,24 | 26,3 |
| | 6 | 6,75 | 68,31 | 1,49 | 2,97 | 38,78 | 24,1 |

В таблице 2 приведены данные о содержании некоторых жирных кислот и родственных химических соединений в необлученной и облученной продукции, которые удавалось наблюдать в хромато-масс-спектрометрическом анализе.

В таблице 2 жирные кислоты и их алкилзамещенные производные указаны как метиловые эфиры жирных кислот в виде суммы свободных и связанных в жире жирных кислот, поскольку в методике анализа применяли метилирование для надежной хроматографической идентификации в режиме газовой хроматографии. В нативном сырье эти вещества содержатся преимущественно в виде свободных жирных кислот или в виде остатков жирных кислот.

В таблице 2 указаны только основные липидные компоненты. В перечне веществ, идентифицированных в составе облученных образцов с дозой 1–6 кГр, было обнаружено более 250 дополнительных органических соединений, в том числе аминов, амидов, кетонов, гетероциклов и других веществ, с суммарным уровнем их содержания от 0,02 до 0,5% в пересчете на жир.

Подавляющее большинство этих веществ не обнаруживалось в исходном сырье. Их общее количество составляло более 18% для образца, облученного дозой 1 кГр, и более 34% для образца, подвергнувшегося облучению с дозой 6 кГр.

Таблица 2

Содержание некоторых веществ в необработанном и радиационно облученном мясном сыре (n=3)

| RT*, мин | Наименование | CAS#** | Содержание в об- лученном образце, г/100 г жира | | | Вероятность масс- спектро- метрической идентифика- ции, % |
|-------------|--|--------------|---|-------|-------|--|
| | | | 0 кГр | 1 кГр | 6 кГр | |
| 4,854 | 1,1-диметоксидодекан | 001599-47-9 | 0 | 0,01 | 0,09 | 76 |
| 6,784 | Метилдеканоат | 000111-11-5 | 0,01 | 0,04 | 0,04 | 68 |
| 8,196 | 4,5-дифенил-1Н-1,2,3-триазол | 005533-73-3 | 0 | 0,15 | 0,2 | 65 |
| 8,922 | Метилдеканоат | 000110-42-9 | 0,08 | 0,17 | 0,26 | 98 |
| 9,612 | 1,1-диметоксигептан | 010032-05-0 | 0 | 0,07 | 0,05 | 67 |
| 10,494 | Метил-6,6-диметоксиоктаноат | 065157-89-3 | 0 | 0,05 | 0,06 | 65 |
| 10,702 | Метилдодеcanoат | 000111-82-0 | 0,11 | 0,34 | 0,32 | 97 |
| 11,408 | 1-антрацен-9-ил-2-(4-диметиламинофенил)этилен | 060949-20-4 | 0 | 0,1 | 0,06 | 65 |
| 11,989 | Метил-12-метилтридеcanoат | 1000336-46-9 | 0 | 0,02 | 0,04 | 96 |
| 12,113 | Метил-11-тетрадеcanoат | 1000130-82-8 | 0 | 0,02 | 0,02 | 75 |
| 12,181 | Метилмиристолеат | 056219-06-8 | 0,13 | 0,62 | 0,59 | 99 |
| 12,291 | Метилтетрадеcanoат | 000124-10-7 | 4,03 | 4,24 | 4,65 | 98 |
| 12,720 | Метил-13-тетрадеcanoат | 1000336-31-4 | 0,06 | 0,08 | 0,13 | 99 |
| 14,163 | Метил-14-метилгексадеcanoат | 002490-49-5 | 0,44 | 0,47 | 0,46 | 97 |
| 14,163 | Метил-15-метилгексадеcanoат | 1000336-34-2 | 0,46 | 0,43 | 0,44 | 94 |
| 14,334 | Метил-гептадеcanoат | 001731-92-6 | 1,69 | 1,65 | 1,58 | 99 |
| 14,853 | Метил-9-октадеcanoат | 001937-62-8 | 31,92 | 30,87 | 30,11 | 98 |
| 15,019 | Метил-6-октадеcanoат | 052355-31-4 | 3,24 | 3,32 | 3,06 | 65 |
| 16,011 | Метил-11-эйкозаноат | 1000333-63-8 | 3,66 | 3,59 | 3,67 | 99 |
| 16,539 | 1,1-доксид-3-(гексагидро-1Н-азепин-1-ил)-1,2-бензизотиазол | 309735-29-3 | 0 | 0,04 | 0,17 | 65 |
| 16,882 | Метил-7,10,13,16-докозатетраеноат | 1000333-54-8 | 0,21 | 0,25 | 0,31 | 96 |
| 17,203 | Метилдокозаноат | 000929-77-1 | 0,11 | 0,1 | 0,19 | 99 |
| 18,428 | Метилтетракозаноат | 002442-49-1 | 0,09 | 0,1 | 0,03 | 98 |
| 22,726 | Холестерин | 000057-88-5 | 0,37 | 0,35 | 0,34 | 95 |

Примечание: * — характеристическое время выхода пик вещества на хроматограмме в ходе анализа; ** — численный идентификатор химических соединений по Международной номенклатуре

Основные вещества, обнаруженные в исходном сыре (наименования приводятся по Международной номенклатуре IUPAC), мг/кг: 2-methylthieno[2',3':3,4]benzo[2,1-d]thiazol-5-ol 0.16, 5-acetamido-4,7-dioxo-4,7-dihydrobenzofurazan 0.06, nonanal dimethyl acetal 0.02, decanoic acid, methyl ester 0.14, 1,2,3,4-tetrahydro-6-phenoxy-carbazol-1-one 0.03, dodecanoic acid, methyl ester 0.19, 6,8-dimethyl-2-(3-nitrobenzylideno)-thiazolo[3,2-a]benzimidazol-3(2H)-one 0.03, 8,8-dimethoxy-2-octanol 0.03, 2-(4-aminophenyl)-4,6-diphenylpyrimidine 0.04, 2,5-dihydroxyacetophenone, bis(ter-t-butyl)dimethylsilyl ether 0.04, methyl-12-methyl-tridecanoate 0.02, 3-[8-cyclohexyloctyl]-1,4-dimethoxynaphthalene 0.16, methyl myristoleate 0.23, methyl tetradecanoate 3.61, 7-(4-methyl-5-phenyl-2H-1,2,3-triazol-2-yl)-3-phenyl-2H-1-benzopyran-2-one 0.20, methyl 13-methyltetradecanoate 0.06, 12-methyl-tetradecanoic acid, methyl ester 0.09, cis-5-dodecenoic acid, methyl ester 0.03, pentadecanoic acid, methyl ester 0.28, pentadecanoic acid, 14-methyl-tetradecanoic acid, methyl

ester 0.10, 7,10-hexadecadienoic acid, methyl ester 0.02, 9-hexadecenoic acid, methyl ester, 6.13, hexadecanoic acid, methyl ester 24.20, 1,1-dimethoxy-dodecane 0.12, methyl-15-methylhexadecanoate 0.26, cis-10-heptadecenoic acid, methyl ester 1.03, heptadecanoic acid, methyl ester 1.26, methyl-6,9,12-octadecatrienoate 0.06, 9-octadecenoic acid, methyl ester, 33.96, 6-octadecenoic acid, methyl ester 3.94, octadecanoic acid, methyl ester 14.73, methyl-9-cis,11-trans-octadecadienoate 0.38, nonanal dimethyl acetal 0.18, methyl-10-trans,12-cis-octadecadienoate 0.19, cis-10-nonadecenoic acid, methyl ester 0.40, nonadecanoic acid, methyl ester 0.13, methoxy-methyl ester 0.10, 2-oxo-3-[3-trifluoromethylbenzoyl]propanoic acid 0.19, 5,8,11,14-icosatetraenoic acid, methyl ester 0.77, methyl-8,11,14-icosatrienoate 0.51, cis-11-icosenoic acid, methyl ester 3.54, icosanoic acid, methyl ester 0.81, 6-octadecenoic acid, methyl ester 0.29, methyl (11R,12R,13S)-(Z)-12,13-epoxy-11-methoxy-9-octadecenoate 0.05, ether, 1-hexadecenyl methyl 0.08, heneicosanoic acid, methyl ester 0.04, m-menth-6-ene, (R)-(+)-Z-4-nonadecen-1-

ol acetate 0.02, 9,10-dimethoxy-hexadecanoic acid, methyl ester 0.02, methyl-6,9,12,15,18-heneicosapentaenoate 0.03, cis-7,10,13,16-docosatetraenoic acid, methyl ester 0.26, cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid, methyl ester 0.11, 13-docosenoic acid, methyl ester 0.07, docosanoic acid, methyl ester 0.06, tetracosanoic acid, methyl ester 0.04, cholesterol 0.34.

Перечень основных веществ, идентифицированных в этом же образце, облученном дозой 6 кГр, включал в себя следующие вещества (мг/кг): hexanal dimethyl acetal 0.09; 1,1-dimethoxyheptane 0.02; octanoic acid, methyl ester 0.02; 1,1-dimethoxydodecane 0.09; 2-phenyl-8H-thieno(2,3-b)indole 0.02; 4,5-diphenyl-1H-1,2,3-triazole 0.20; corydaldine 0.21; nonanal dimethyl acetal 0.13; decanoic acid, methyl ester 0.26; decanal dimethyl acetal 0.09; 1-methoxyheptane 0.05; oxoprophines 0.08; 6,6-dimethoxy-octanoic acid, methyl ester 0.06; 2-(3,5-diphenyl-pyrazol-1-yl)-benzothiazole 0.02; dodecanoic acid, methyl ester 0.32; 6,8-dimethyl-2-(3-nitrobenzylideno)-thiazolo[3,2-a]benzimidazol-3(2H)-one, 0.10; 3-methyl-hepta-1,6-dien-3-ol 0.24; 1-anthracen-9-yl)-2-(4-dimethylaminophenyl)ethene 0.06; colchicine 0.02; methyl-12-methyltridecanoate 0.04; 1,1-dimethoxy-octadecan 0.09; methyl-Z-11-tetradecenoate 0.02; 5-[3,4-dimethylanilido]-7-[3,4-dimethylanilino]-5H-8-quinolone 0.14; methyl myristoleate 0.59; methyl tetradecanoate 4.65; methyl-13-methyltetradecanoate 0.13; methyl-15-methyltetradecanoate 0.18; 7-hexadecenoic acid, methyl ester 0.04; pentadecanoic acid, methyl ester 0.44; 14-methylpentadecanoic acid, methyl ester 0.23; 9-hexadecenoic acid, methyl ester 7.54; hexadecanoic acid, methyl ester 22.27; 9-охо-nonanoic acid, methyl ester 0.07; 1-hexadecenyl 0.15; methyl-15-methylhexadecanoate 0.29; 14-methylhexadecanoic acid, methyl ester 0.46; cis-10-heptadecenoic acid, methyl ester 1.30; heptadecanoic acid, methyl ester 1.58; 10,13-octadecadienoic acid, methyl ester 30.10; 9-octadecenoic acid, methyl ester 3.06; octadecanoic acid, methyl ester 9.98; 14-methylpentadecanoic acid, methyl ester 2.16; methyl-10-trans,12-cis-octadecadienoate 0.85; n-propyl-9,12-octadecadienoate 0.29; methyl-10-trans,12-cis-octadecadienoate 0.22; cis-10-nonadecenoic acid, methyl ester 0.21; methyl-9,10-methylene-octadecanoate 0.31; nonadecanoic acid, methyl ester 0.18; methyl-9-cis,11-trans-octadecadienoate 0.14; 2-methoxydecanoic acid 0.08; 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid, methyl ester 0.70; methyl 8,11,14-eicosatrienoate 0.66; cis-11-eicosenoic acid, methyl ester 3.67; methyl-18-methylnonadecanoate 0.88; 14-octadecenoic acid, methyl ester 0.18; 2-n-butylacrolein 0.14; 4-Acetyl-cyclohexanone 0.27; dihydrotestosterone 0.12; 3-(hexahydro-1H-azepin-1-yl)-1,2-benzisothiazole,

1,1-dioxide 0.17; 11,13-eicosadienoic acid, methyl ester 0.05; heneicosanoic acid, methyl ester 0.12; 10,12-hexadecadien-1-ol acetate 0.10; 6-hydroxy-2-pyrazinecarboxylic acid, methyl ester 0.23; cis-7,10,13,16-docosatetraenoic acid, methyl ester 0.31; cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid, methyl ester 0.17; methacrylic acid, heptadecyl ester 0.13; mesityl oxide semicarbazone 0.13; 13-docosenoic acid, methyl ester 0.35; docosanoic acid, methyl ester 0.19; methyl(11R,12R,13S)-12,13-эпоху-11-метоху-9-октадецеаноате 0.30; 3,5-dimethyl-1-[4-(1H-pyrrol-1-yl)phenyl]-1H-pyrazole 0.20; 15-tetracosenoic acid, methyl ester 0.04; tetracosanoic acid, methyl ester 0.03; cholesterol 0.34.

Из представленных данных видно, что главная доля липидных компонентов, преимущественно жирных кислот, которых, как известно, в жировой части объектов природного происхождения достаточно много, сохранилась в облученном материале в неизменном виде. Однако в облученных образцах наблюдались определенные, достаточно значимые изменения в составе и строении составляющих компонентов. Так, встречалась миграция двойных химических связей в некоторых непредельных жирных кислотах, то есть происходило достоверное изменение жирнокислотного состава [19], выявлялось образование отсутствовавших в начальных образцах производных акролеина, антрацена и других довольно небезопасных для человека химических веществ.

В продуктах облучения отмечались различные ароматические соединения, которые отсутствовали в необлученном сырье и которые, как известно, могут вызывать неприятные и даже опасные для человека последствия при их потреблении с продуктами питания.

Также в облученных продуктах встречалось образование некоторого количества изомеров жирных кислот, например, 12-метилтридеcanoата, 11-тетрадецеаноата и др., которые, как правило, полностью отсутствуют в сырье животного происхождения или их количество в начале естественного биосинтеза жирных кислот незначительно, как, например, 13-тетрадецеаноат.

Полученные данные указывают на возможное развитие процессов конформационных превращений жирных кислот, результаты которого наблюдались даже при низких дозах облучения в 1 кГр.

Во всех пищевых системах, в том числе на основе животной ткани, важнейшим компонентом являются белки и составляющие их природные L-аминокислоты, которые образуют гликопротеиновые макрокомплексы. Массовая доля белковых веществ в зависимости от объекта обычно составляет 10–20%. В таблице 3 представлены данные аминокислотного состава исследованных объектов.

В результате облучения полный суммарный аминокислотный состав, на первый взгляд, изменился мало, однако содержание некоторых аминокислот, устанавливаемое в стандартном аминокислотном анализе [10], уменьшилось. Изменились в худшую сторону также важные для приготовления пищевых белковых систем соотношения N/E и MET/ИЛЕ, что позволяет утверж-

дать, что радиационная обработка образцов на основе животного сырья с дозами облучения до 6 кГр приводит к изменению аминокислотного состава. В таблице 3 для сравнения приведен аминокислотный анализ эталонного белка — альбумина. Видно, что аминокислотный состав облученного образца отличается от эталона больше, чем в случае необлученного образца.

Таблица 3

Аминокислотный состав облученного и необлученного сырья, г/100 г белка

| Аминокислота | Белок с максимально сбалансированным составом аминокислот (яичный альбумин) | Исходный образец на основе животного сырья | Образец, облученный дозой 6 кГр |
|--|---|--|---------------------------------|
| Незаменимые (N), в т.ч. | 53,9 | 48,61 | 41,62 |
| ИЛЕ | 6,9 | 4,66 | 4,93 |
| ЛЕЙ | 8,2 | 8,41 | 8,11 |
| ЛИЗ | 7,6 | 10,3 | 6,23 |
| МЕТ | 4,8 | 3,21 | 2,66 |
| ЦИС | 1,9 | 1,12 | 1,03 |
| ФЕН | 4,8 | 4,62 | 4,55 |
| ТИР | 5,8 | 3,77 | 3,78 |
| ТРЕ | 7,0 | 5,81 | 4,92 |
| ТРП | 2,0 | 1,24 | 0,87 |
| ВАЛ | 4,9 | 5,47 | 4,56 |
| Заменимые (E), в т.ч. | 54,7 | 46,15 | 44,14 |
| АЛА | 6,7 | 3,41 | 3,63 |
| АРГ | 5,7 | 7,32 | 7,80 |
| АСП | 9,3 | 7,75 | 7,45 |
| ГАМК | 0,01 | 0,01 | 0 |
| ГИС | 2,4 | 3,32 | 2,11 |
| ГЛИ | 3,1 | 3,26 | 2,24 |
| ГЛУ | 16,5 | 15,9 | 16,4 |
| ПРО | 5,1 | 3,17 | 2,92 |
| СЕР | 5,9 | 2,02 | 1,59 |
| N/E | 0,98 | 1,05 | 0,93 |
| MET/ИЛЕ | 0,70 | 0,68 | 0,54 |
| Массовая доля белка в природном образце, % | 12,5 | 17,8 | 17,6 |

Известно, что под воздействием высокоэнергетических факторов в сочетании с наличием кислорода ряд аминокислот претерпевает определенные превращения. Так, цистеин дает соединения с сульфоновыми и дисульфидными S-S-связями, метионин легко подвергается дальнейшему окислению, гистидин образует 2-оксо-гистидин, пролин и аргинин образуют окси-производные, триптофан дает 6-нитротриптофан. Практически все аминокислоты способны образовывать N, S, O-замещенные производные [5].

Уменьшение массовой доли отдельных аминокислот, представленное в таблице 2, свидетельствует о том,

что происходящие под воздействием радиационного облучения изменения аминокислот белков при облучении до 6 кГр приводят и к соответствующему изменению белкового статуса пищевого продукта

Необходимо отметить, что сравнение необлученного образца с облученным показало, что содержание оксипролина, оцениваемое стандартным методом [10], во всех облученных образцах с дозой от 1 до 6 кГр возрастало с 0,05 до 0,6% от массы образца. То есть, процесс радиолитического разложения животной ткани приводил к кратному возрастанию содержания пролина, трансформированного в

оксипролин. Пероксидное число также увеличивалось с 1,1 до 2,35 ммоль акт. O_2 /кг жира. Следует также подчеркнуть, что массовая доля свободных аминокислот от обычного естественного уровня в 0,05–0,2% возрастала до 0,3–0,7%, что указывает на развитие гидролитических процессов в облученных образцах [11].

Наши исследования последних лет показывают, что вкусо-ароматические характеристики пищевых продуктов определяются синергетическим эффектом наличия сотен органических веществ с массовой долей их содержания значительно менее 0,001% [7, 11, 19]. И этот уровень контаминации химическими веществами фактически оказывается затронутым радиационным гамма-облучением.

Таким образом, обычно применяемый уровень облучения продукции на основе животного сырья дозами более 1 кГр приводит к достаточно существенному изменению химического состава продукта.

Заключение

Проведенный методом хромато-масс-спектрометрии анализ изменений в химическом составе продукции пищевого назначения позволил выявить факт изменения компонентного состава пищевых матриц в результате их обеззараживающего гамма-облучения. Исследования показали, что применяемое радиационное γ -облучение животного сырья и пищевых продуктов на его основе, дающее возможность увеличивать сроки хранения сырья и продукции, приводит к изменениям химического состава важнейших веществ, способствуя радиационно-химическому превращению компонентов.

Дальнейшие исследования опасности или безопасности такой продукции должны обязательно проводиться для получения достоверных данных о полезности и полной безопасности облученной пищевой продукции. Очевидно, что пищевая продукция с искусственно измененным под радиационным облучением химическим составом не может быть признана благоприятной.

Литература

1. Безопасность и пищевая ценность облученной пищи. — М.: Медицина, 1995. — 211 с.
2. Болдырев В.С., Ермолаева В.И., Синкевич В.В., Фадеев Г.Н. Дестабилизация соединения хелатной структуры поливинилпирролидон-иода в поле низкочастотных воздействий // Вестник МГТУ им. Н.Э. Баумана. Серия Естественные науки. — 2017. — № 4. — С. 90–99. doi: 10.18698/1812-3368-2017-4-90-99.

3. Гельфанд С.Ю., Петров А.Н., Филиппович В.П., Проккопенко А.В., Завьялов М.А. Современные аспекты радиационной обработки пищевых продуктов // Хранение и переработка сельхозсырья. — 2013. — № 2. — С. 25–31.
4. Горбунова Н.А. Перспективы применения технологии ионизирующего облучения мяса и мясных продуктов // Мясная индустрия. — 2016. — № 9. — С. 21–23.
5. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. Пер. с англ. — М.: Мир, 1965. — 826 с.
6. Дроздова Н.А., Дыдыкин А.С., Горбунова Н.А., Семенова А.А. Применение ионизирующего и неионизирующего излучения в пищевой промышленности // Все о мясе. — 2017. — № 1. — С. 16–19.
7. Иванкин А.Н., Вострикова Н.Л., Куликовский А.В., Становова И.А., Курзова А.А., Фадеев Г.Н., Болдырев В.С. Радиационная обработка пищевых продуктов на основе мясного сырья // Мясная индустрия. — 2017. — № 11. — С. 26–29.
8. Исамов Н.Н., Санжарова Н.И., Кобялко В.О., Козьмин Г.В., Павлов А.Н., Губарева О.С., Полякова И.В., Урсу Н.В., Алешкина Е.Н. Применение радиационных технологий для обеспечения безопасности продуктов животного происхождения // Все о мясе. — 2017. — № 1. — С. 11–15.
9. Куликовский А.В., Вострикова Н.Л., Горбунова Н.А., Иванкин А.Н. Идентификация накопления химических маркеров облучения в биоматрицах при ионизирующей обработке мясного сырья // Все о мясе. — 2017. — № 1. — С. 21–25.
10. Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Методы практической биотехнологии. — М.: Изд-во ВНИИМП, 2002. — 402 с.
11. Неклюдов А.Д., Бердугина А.В., Иванкин А.Н., Карпо Б.С. Кинетические характеристики ферментативного гидролиза сложных белково-минеральных субстратов // Прикладная биохимия и микробиология. — 2002. — Т. 38. — № 4. — С. 328–335.
12. Петриченко Л.К., Васильева А.Г. Влияние ионизирующих излучений на продукты питания // Известия вузов. Пищевая технология. — 2004. — № 1. — С. 95–98.
13. Фадеев Г.Н., Болдырев В.С., Ермолаева В.И. Биологически активные клатраты амилоидин и амилопектоидин в поле низкочастотных акустических воздействий // Доклады Академии наук. — 2012. — Т. 446. — № 4. — С. 466–470.
14. Ahn D.U., Lee E.J., Feng X., Zhang W., Lee J.H., Jo S., Nam R. Mechanisms of volatile production from sulfur-containing amino acids by irradiation // Radiation Physics and Chemistry. — 2016. — Vol. 119(1). — P. 80–84. doi: 10.1016/j.radphyschem.2015.09.009.
15. Chouliara I., Samelis J., Kakouri A., Badeka A., Savvaidis I.N., Riganakos K., Kontominas M.G. Effect of irradiation of frozen meat/fat trimmings on microbiological and physi-

- cochemical quality attributes of dry fermented sausages // *Meat Science*. — 2006. — Vol. 74(10). — P. 303–311. doi: 10.1016/j.meatsci.2006.03.021.
16. Directive 1999/2/EC of the European Parliament and of the Council on the approximation of the laws of Member States concerning foods and food ingredients treated with ionising radiation. OJ L 66, 13.3.1999.
 17. *El-Desouky W., Mahmoud A.H., Abbas M.M.* Antioxidant potential and hypolipidemic effect of whey protein against gamma irradiation induced damages in rats // *Applied Radiation and Isotopes*. — 2017. — Vol. 129(1). — P. 103–107. doi: 10.1016/j.apradiso.2017.07.058.
 18. *Hartwig A., Pelzer A., Burnouf D., Titeca H., Delincee H., Briviba K., Soika C., Hodapp C., Raul F., Miesch M., Werner D., Horvatovich P., Marchioni E.* Toxicological potential of 2-alkylcyclobutanones — specific radiolytic products in irradiated fat-containing food — in bacteria and human cell lines // *Food and Chemical Toxicology*. — 2007. — Vol. 45(12). — P. 2581–2591. doi: doi.org/10.1016/j.fct.2007.05.033.
 19. *Ivankin A.N., Oliferenko G.L., Kulikovskii A.V., Chernuha I.M., Semenova A.A., Spiridonov K.I., Nasonova V.V.* Determination of unsaturated fatty acids with a migrating double bond in complex biological matrices by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometry detection // *Journal of Analytical Chemistry*. — 2016. — Vol. 71(11). — P. 1131–1137. doi: 10.1134/S1061934816110046.
 20. *Lee J.Y., Cho S.B., Kim Y.Y., Ohh S.J.* Effect of gamma irradiation and autoclaving on sterilization and amino acids digestibility of diets for specific pathogen free mini-pigs containing either soybean meal or whey protein // *Livestock Science*. — 2012. — Vol. 149(1–2). — P. 201–207. doi: 10.1016/j.livsci.2012.07.010.
 21. *Zanardi E., Caligiani A., Palla L., Mariani M., Ghidini S., Di Ciccio P.A., Palla G., Ianieri A.* Metabolic profiling by ¹H NMR of ground beef irradiated at different irradiation doses // *Meat Science*. — 2015. — Vol. 103(5). — P. 83–89. doi: 10.1016/j.meatsci.2015.01.005.
 22. *Zhang H., Wang W., Wang H., Ye Q.* Effect of e-beam irradiation and microwave heating on the fatty acid composition and volatile compound profile of grass carp surimi // *Radiation Physics and Chemistry*. — 2017. — Vol. 130(2). — P. 436–441. doi: 10.1016/j.radphyschem.2016.10.007.
 23. *Zhao L., Zhang Y., Pan Z., Venkitasamy C., Zhang L., Xiong W., Guo S., Xia H., Liu W.* Effect of electron beam irradiation on quality and protein nutrition values of spicy yak jerky // *LWT — Food Science and Technology*. — 2018. — Vol. 87(1). — P. 1–7. doi: 10.1016/j.lwt.2017.08.062.

PHYSICO-CHEMICAL TRANSFORMATION OF THE COMPONENT COMPOSITION OF FOOD PRODUCTS UNDER THE INFLUENCE OF HIGH-ENERGY RADIATION

A.V. KULIKOVSKII¹, N.L. VOSTRIKOVA¹, V.S. BOLDYREV², G.N. FADEEV²,
A.N. IVANKIN², V.A. BELYAKOV²

¹*V.M. Gorbatov Federal Scientific Center of Food Systems,*
²*Bauman Moscow State Technical University, Moscow*

Some aspects of the formation and transformation of organic substances in food systems based on raw materials of animal origin under the influence of radiation exposure with a dose of 1–6 kGy have been studied by chromatographic mass spectrometry. Modeling mixtures of animal raw materials and food products based on it were used as objects of research. Studies have shown that the applied γ -irradiation, which allows increasing the shelf life, leads to changes in the chemical composition of the most important components, contributing to the radiation-chemical transformation of chemicals. It was shown that the migration of double chemical bonds of unsaturated fatty acids took place in the irradiated samples, formation of some of the isomers of fatty acids, such as 12-methyltridecanoate, 11-tetradecenoate, formation of derivatives of acrolein and anthracene was absent in the initial samples. In the irradiation products, other aromatic compounds were observed, which were absent in the unirradiated raw material. It was shown that even with low irradiation doses of 1 kGy, the transformation of natural amino acids occurred in the irradiated products, in particular, the content of hydroxyproline increased, the mass fraction of free amino acids increased from 0.05–0.2% to 0.3–0.7%. It was concluded that γ -irradiation used for microbiological disinfection of food systems leads to changes in the chemical composition of products, which can affect both the flavor and aroma characteristics and the safety of food products in general.

Keywords: radiation exposure, chemical composition of food products.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО РОСТА *TRICHODERMA ATROBRUNNEUM* НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ С РАЗЛИЧНЫМИ УГЛЕВОДНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ

И.А. ГНЕУШЕВА*, А.В. ЛУШНИКОВ, Н.Е. ПАВЛОВСКАЯ, О.А. МАРКИНА

ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина», Орел

Интенсивность биосинтеза микробных метаболитов зависит от скорости потребления углеводов продуцентом из питательной среды. Благоприятные условия для биосинтетической деятельности обеспечиваются быстрым ростом мицелия продуцента в первой фазе ферментации с последующим его замедлением. В исследовании математическими расчетами показано, что для оптимального роста продуцента бактериостатических метаболитов *T. atrobrunneum* наиболее значимым является углеводный компонент питательной среды — сахароза, в присутствии которой рост биомассы мицелия идет быстрее: время генерации сокращено на 27,34%, метаболический коэффициент выше на 74,79% от среднего. K_s (субстратная константа) и μ_{max} (удельная максимальная скорость) служат важнейшими параметрами, характеризующими рост микроорганизмов в периодической культуре. Они позволяют спрогнозировать, насколько устойчиво будет идти культивирование и насколько полно компонент может быть извлечен из среды микробным продуцентом с максимальным выходом целевого продукта.

Ключевые слова: *Trichoderma atrobrunneum*, бактериостатические метаболиты, сахароза, кинетика роста, субстратная константа, удельная максимальная скорость.

Введение

Признано, что лучшими продуцентами антибиотических соединений являются почвенные микроскопические организмы, причем около 45% микробных антибиотиков продуцируются мицелиальными грибами аскомицетного аффинитета порядков *Eurotiales* и *Hypocreales*, такими как *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Tolyposcladium*. Почти 99% продуцируемых ими метаболитов успешно используются в медицине, ветеринарии и современных агробiotехнологиях [5, 10].

Интересны для биотехнологов представители рода *Trichoderma* spp., среди которых установлены продуценты новых мембранно-активных пептидов — пептаиболов (триховиринов, трихорзинов, сузуказилинов и др.), позволяющих преодолеть антибиотикорезистентность микробных возбудителей [2, 6, 9]. Низкомолекулярные соединения *Trichoderma* spp. также проявляют антимикробную активность в отношении многих патогенных

микроорганизмов [1, 8]. Каждый отдельный штамм микромицета обладает определенной антибиотико-образующей способностью (Лурье, 1963). Поэтому исследования в области поиска перспективных штаммов *Trichoderma* spp., которые в лабораторных условиях культивирования способны синтезировать так называемые «выгодные» метаболиты, являются в настоящее время перспективными и актуальными [7].

Благоприятным условием для биосинтеза многих антибиотиков служит быстрый рост мицелия продуцента в первой фазе ферментации с последующим его замедлением. Интенсивность биосинтеза зависит от скорости потребления углеводов. Для синтеза высокомолекулярных антибиотических соединений необходим азот [4].

Биосинтетической деятельностью микроорганизмов можно управлять путем изменения условий культивирования микроорганизма и, в первую очередь, соотношением концентрации источников углерода или азота в питательной среде. Например, культура *Bacillus licheniformis* продуцирует группу полипептидных антибиотиков лихениформинов. Однако в зависимости от состава среды этот организм может образовывать другие полипептиды — бацитрацины. Было отмечено влияние явления катаболитной репрессии на биосинтез антимикробных соединений данным микроорганизмом, добавление глюкозы к культуре в высоких концентрациях приводит к снижению уровня синтеза антибиотика [3].

© 2018 г. Гнеушева И.А., Лушников А.В., Павловская Н.Е., Маркина О.А.

* **Автор для переписки:**

Гнеушева Ирина Алексеевна

доцент кафедры биотехнологии, кандидат технических наук
ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина»

E-mail: obc1-2010@mail.ru

Исходя из вышесказанного, целью настоящей работы являлось математическое обоснование оптимального роста *Trichoderma atrobrunneum*, продуцента низкомолекулярных бактериостатических метаболитов, на питательной среде Чапека с различными углеводными компонентами.

Материалы и методы

Штамм-продуцент низкомолекулярных бактериостатических метаболитов. В работе использовали штамм *Trichoderma atrobrunneum* F.V. Rocha, P. Chaverri & W. Jaklitsch, 2015, синтезирующий биологически активные соединения, микробиологическая активность которых в отношении *Bacillus coagulans* составляет 33,4 мм; *Aspergillus niger* – 27,0 мм; *Bacillus subtilis* – 23,5 мм; *Bacillus anthracis* 55-ВНИ-ИВВиМ – 23,0 мм; *Escherichia coli* ATCC 25922 – 22 мм, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – 12,2 мм (по МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания»).

Глубинное культивирование *Trichoderma atrobrunneum* осуществляли в лабораторном ферментере на 3,0 л с автоматическим контролем pH среды подачей стерильного 10% раствора NaOH. Эксперимент проводили на солевой основе среды Чапека при источнике углерода в массовых долях, пересчитанных на 12,5; 25; 37,5; 50; 62,5; 75; 87,5; 100; 150; 200; 250% от классической навески, предусмотренной методикой приготовления. В качестве углеводного компонента использовали: дисахариды – лактозу, сахарозу; моносахариды – глюкозу, фруктозу (продукты гидролиза дисахаридов).

Культуру *T. atrobrunneum* вносили из расчета 0,5 к питательной среде, инкубировали при 28 °С. Объем посевного материала культуры, находящейся в конце экспоненциальной фазы роста, составлял 5% от объема среды.

Параметры роста культуры определяли в экспоненциальную фазу денситометрически на приборе «Densi-La-Metr» (Лахема), с параллельным пересчетом в КОЕ/мл, согласно методу прямого подсчета на плотной питательной среде в чашках Петри по Коху. Момент выхода культуры на линейную фазу роста фиксировали графоаналитически.

Концентрацию моносахаридов определяли по редуцирующим веществам (РВ) методом Вишнякова (2009). 1 часть супернатанта соединяли с 2 частями реактива Фелинга. Инкубировали 3 минуты при температуре

100 °С, измеряли оптическую плотность при длине волны 670 нм. Концентрацию РВ определяли по формуле:

$$C = \frac{D_x - D_0 + 0,012}{0,2946} \times R,$$

где:

D_x – оптическая плотность рабочего определения;

D_0 – оптическая плотность холостого определения;

R – коэффициент разведения;

0,012 – поправка, связанная с увеличением поглощения при 670 нм собственно медно-щелочного раствора при нагревании в течение 3 мин;

0,2946 – абсолютное значение тангенса угла наклона градуировочной кривой.

Для определения концентрации дисахаридов культуральную жидкость центрифугировали 10 минут с ускорением 10000 g при температуре 4 °С, отбирали супернатант. В мерной колбе соединяли 10 частей супернатанта и 1 часть $HCl_{конц.}$ ($\rho_{20} = 1,188$) инкубировали 8 минут при температуре 68–70 °С, с перемешиванием, охлаждали до 20 °С. Реакционную смесь нейтрализовали 20%-ным раствором NaOH, контролируя процесс по лакмусу, доводили водой до метки, определяли содержание редуцирующих веществ.

Массовую долю углевода рассчитывали по формуле:

$$C = (C_n - C_0) \times 0,95,$$

где C_n – концентрация РВ после инверсии;

C_0 – концентрация РВ до инверсии;

0,95 – коэффициент пересчета инвертированного сахара в неинвертированный.

Кинетические характеристики роста продуцента рассчитывали по результатам эксперимента, согласно формулам:

| | |
|--|--|
| - Удельная скорость роста | $\mu = \frac{dX}{dt} \times \frac{1}{X}$ |
| - Максимальная удельная скорость роста | $\mu_m = \frac{K_s}{tg''}$ |
| - Время генерации | $g = \frac{\ln 2}{\mu}$ |
| - Константа скорости деления | $v = \frac{1}{g}$ |
| - Число клеточных делений | $n = v \times t$ |
| - Экономический коэффициент | $Y = \frac{dX}{dS}$ |
| - Метаболический коэффициент | $q = \frac{\mu}{Y}$ |

Субстратную константу (K_s) определяли графоаналитически, используя метод двойных обратных величин Лайнуивера – Берка. Обработку данных проводили в пакете программ MS Office 2010, где путем линейной аппроксимации получали уравнение функции $1/\mu_0 = f(1/S_0)$ вида $y=ax+b$. Из параметров данного равенства находили величины субстратной константы (K_s), равной отношению значений коэффициента приращения (а) и коэффициента смещения (b), и тангенса угла наклона аппроксимирующей прямой к оси абсцисс ($\text{tg } \alpha$), численно равного значению коэффициента приращения (а).

Результаты и обсуждение

Для установления оптимального углеводного компонента в питательной среде биосинтеза низкомолекулярных бактериостатических метаболитов культурой *T. atrobrunneum* на первом этапе работы оценивали влияние лактозы, сахарозы, глюкозы и фруктозы на параметры роста культуры в условиях глубинного периодического культивирования (рис. 1). Для приготовления среды использовали солевую основу среды Чапека с полной рецептурной навеской по углеводу.

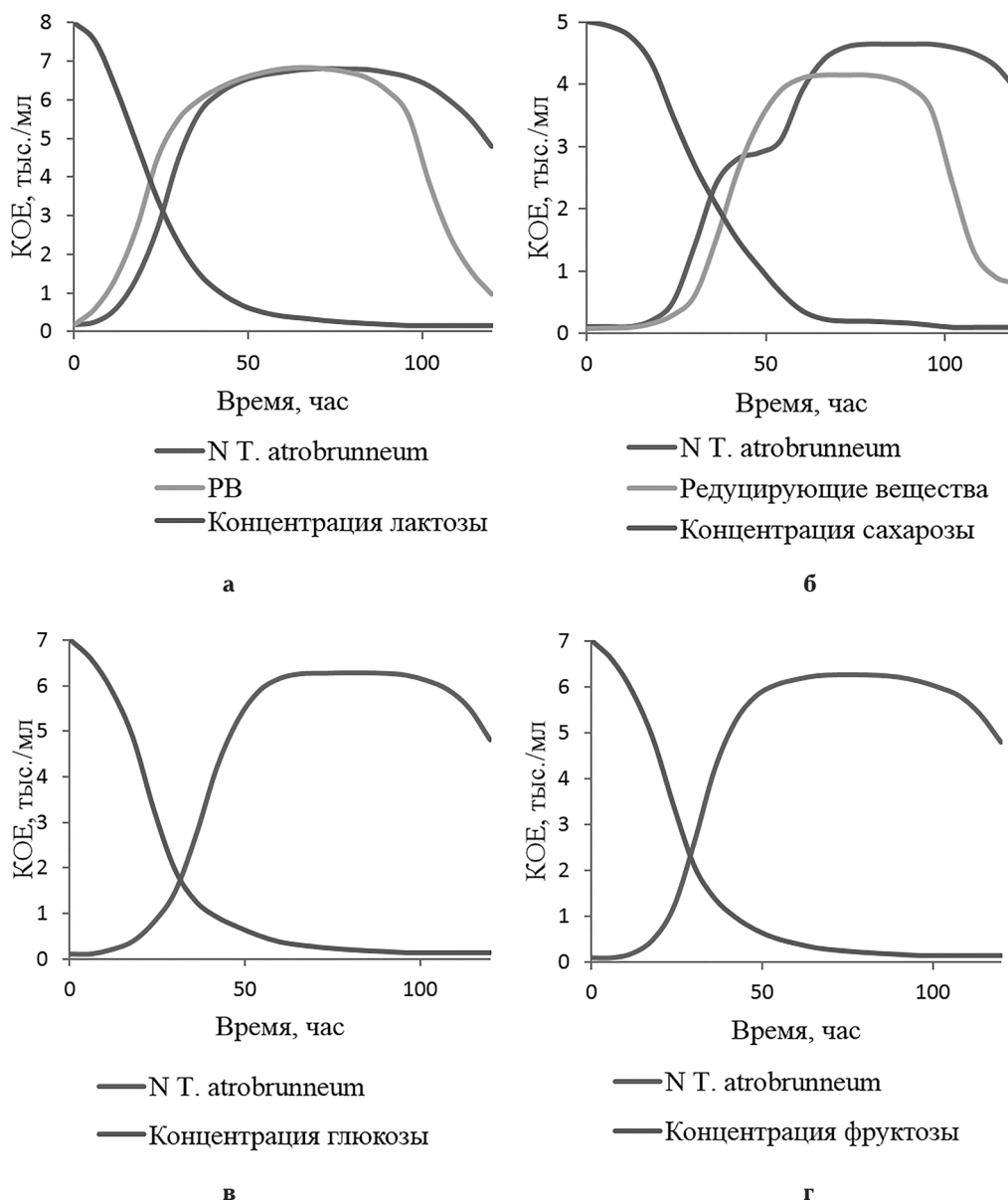


Рис. 1. Кривые роста *T. atrobrunneum* в среде с: а — сахарозой; б — лактозой; в — глюкозой; г — фруктозой (n=10, $p < 0,05$)

Показано, что продолжительность лаг-фазы при использовании в качестве углеводного компонента в питательной среде рецептурной навески сахарозы минимальна,

что предполагает быстрый выход на фазу экспоненциального роста. Параметры кинетики роста культуры *T. atrobrunneum* в заявляемых условиях представлены в таблице 1.

Параметры кинетики роста культуры *T. atrobrunneum* в условиях культивирования с различным углеводным компонентом среды

| Источник углеводов | Параметры | | | | | |
|--------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | μ , ч ⁻¹ | g, ч | v, делений/ч | n, делений | Y | q, г/КОЕ×ч×л |
| Лактоза | 0,054 ±0,01 | 12,762 ±0,14 | 0,078 ±0,01 | 12,078 ±0,18 | 2,46 ±0,23 | 0,022 ±0,01 |
| Сахароза | 0,084 ±0,01 | 8,26 ±0,92 | 0,121 ±0,02 | 12,121 ±0,02 | 0,938 ±0,07 | 0,104 ±0,04 |
| Глюкоза | 0,058 ±0,01 | 11,99 ±2,46 | 0,083 ±0,01 | 12,083 ±0,84 | 1,4 ±0,15 | 0,041 ±0,01 |
| Фруктоза | 0,057 ±0,01 | 12,464 ±0,67 | 0,08 ±0,01 | 12,08 ±1,01 | 0,777 ±0,19 | 0,071 ±0,01 |

В приведенной таблице показано, что на обозначенных субстратах удельная скорость роста биомассы в среднем составила $0,063 \pm 0,01$ ч⁻¹ ($C_v = 22,04\%$). Максимальное значение показателя установлено в варианте опыта с сахарозой ($0,084 \pm 0,01$). При этом в процессе культивирования кривая прироста биомассы получила S-образный изгиб с образованием промежуточного комплекса {(фаза замедления 1)-(стационарная фаза 1)-(лаг-фаза 2)}. Очевидно, это может быть связано с явлением насыщения субстратом, так как утилизация одной молекулы сахарозы приводит к высвобождению двух молекул моносахаридов: глюкозы и фруктозы, которые, в свою очередь, также являются субстратами для *T. atrobrunneum*.

По мере утилизации сахарозы глюкоза и фруктоза, накапливаясь, создают критическую концентрацию, при которой происходит замедление прироста биомассы. В сложившейся ситуации происходит культивирование в продленной периодической системе, с подпиткой среды за счет самообогащения при расщеплении первичного субстрата на вторичные.

По результатам эксперимента, в среднем время генерации культуры (g) составило $11,369 \pm 2,1$ ч ($C_v = 18,44\%$). Максимальное значение g определяется при использовании в качестве углеводного компонента питательной среды лактозы и составляет $12,762 \pm 0,14$ ч, тогда как у сахарозы, глюкозы и фруктозы этот показатель выше на $35,27/6,05/2,33\%$, соответственно.

Другими словами, период, в течение которого осуществляется деление клетки, сокращается в порядке: лактоза > фруктоза > глюкоза > сахароза; следовательно, скорость деления (v) и число клеточных делений (n) изменяются обратно и прямо пропорционально времени генерации, соответственно.

Для оценки метаболического статуса продуцента рассчитывали метаболический коэффициент (q) — удельную скорость метаболизма, выраженную скоростью потребления субстрата культурой в данный момент времени. Этот показатель обратно пропорционален экономическому коэффициенту (Y), характеризующему количественную потребность организма в субстрате; он определяется как выход биомассы по утилизированному субстрату.

Из экспериментальных данных вычислено, что метаболическая активность *T. atrobrunneum* изменяется в порядке: сахароза > фруктоза > глюкоза > лактоза. Наибольшей величины данный показатель достиг в опыте с сахарозой и составил $0,104 \pm 0,04$ г/КОЕ·ч·л, что соответствует наименьшему экономическому коэффициенту — $0,938 \pm 0,07$. Очевидно, сахароза является оптимальным компонентом питательной среды, в которой возможно сочетание рационального прироста биомассы, необходимого для биосинтеза целевого продукта.

Для расчета K_S , μ_{max} строили графики зависимости $1/\mu_0 = f(1/S_0)$, используя параметры роста *T. atrobrunneum*, полученные при глубинном культивировании (рис. 2).

На основании графоаналитического эксперимента были получены значения субстратной константы и максимальной удельной скорости роста, представленные в таблице 2.

Субстратная константа (K_S) и максимальная удельная скорость (μ_{max}) являются наиболее важными характеристиками кинетики роста микроорганизмов, обоснованными физиолого-биохимическими особенностями штамма, условиями культивирования, природой утилизируемого субстрата и его концентрацией в среде. Так, K_S характеризует сродство субстрата и ферментов клетки, при этом обратно пропорциональна μ_{max} .

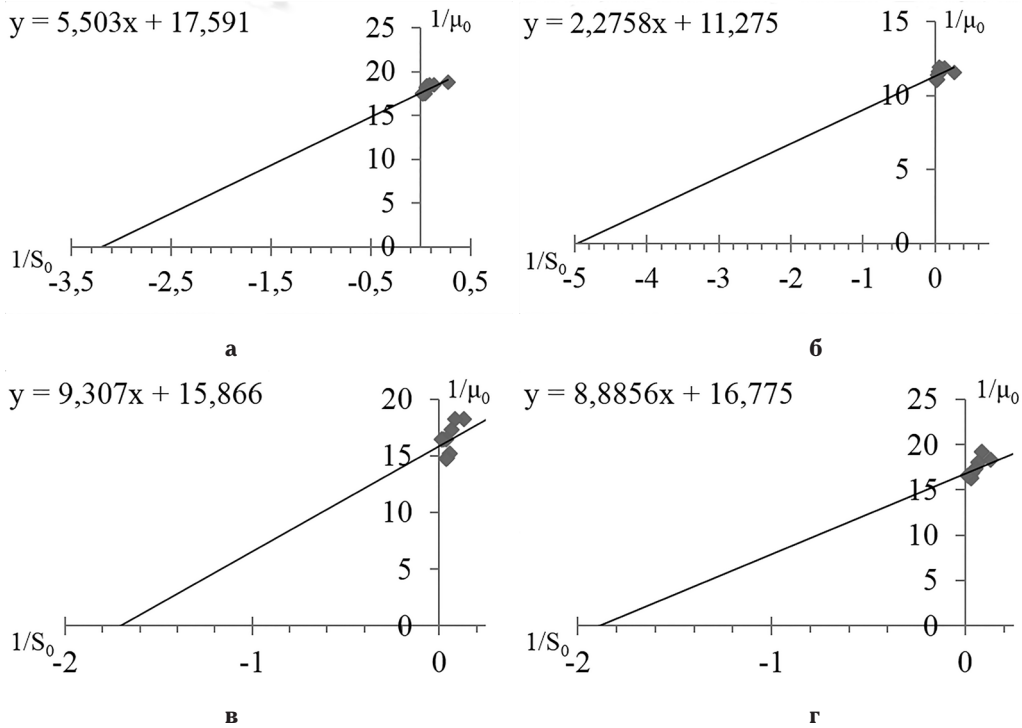


Рис. 2. График зависимости удельной скорости роста культуры *T. atrobunneum* от концентрации субстрата: а — лактозы; б — сахарозы; в — глюкозы; г — фруктозы в координатной системе Лайнуивера — Берка ($n=10$, $\rho < 0,05$)

Таблица 2

Константы кинетики роста культуры *T. atrobunneum* в условиях культивирования с различным углеводным компонентом среды

| Кинети- ческие константы | Углеводы | | | |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| | лактоза | сахароза | глюкоза | фруктоза |
| K_s , г/л | $0,328 \pm 0,23$ | $0,202 \pm 0,18$ | $0,587 \pm 0,14$ | $0,53 \pm 0,12$ |
| μ_{max} , ч ⁻¹ | $0,059 \pm 0,01$ | $0,089 \pm 0,01$ | $0,063 \pm 0,01$ | $0,06 \pm 0,01$ |

В нашем исследовании установлено, что из представленных субстратов наименьшее значение субстратной константы определяется в опыте с сахарозой. K_s сахарозы равна $0,202 \pm 0,18$ г/л, что на 50,9% ниже медианы по выборке ($C_v = 43,38\%$). Этот факт свидетельствует о максимальном средстве культуры к данному субстрату — в рамках поставленного эксперимента. Максимальная удельная скорость роста *T. atrobunneum* в среднем составила $0,068 \pm 0,01$ ч⁻¹ ($C_v = 21,06\%$). Минимальные значения μ_{max} показали постановки с лактозой и фруктозой на 12,91% и 11,43% ниже среднего, соответственно. Наибольшее значение определено в опыте с сахарозой $0,089 \pm 0,01$ ч⁻¹, что подтверждается соответствующим значением K_s .

В ходе эксперимента была определена зависимость активности *T. atrobunneum* от углеводного компонента среды, использованного при культивировании, пред-

ставленная графиком на рисунке 3. В качестве критериев влияния субстрата на культуру использовали K_s и q .

Исходя из данных графика, получили отрицательную корреляцию между K_s субстрата и q продукта, коэффициент корреляции $-0,42$. Действительно, чем ниже значение субстратной константы (K_s), тем активнее микроорганизм утилизирует данный субстрат.

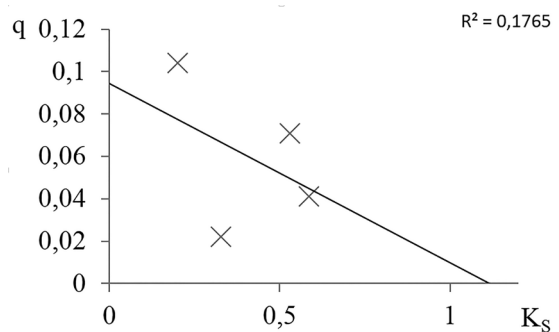


Рис. 3. Корреляция между величиной субстратной константы (K_s) и метаболическим коэффициентом *T. atrobunneum* (q). Коэффициент корреляции $-0,42$; $\rho < 0,05$

Заключение

На основании проведенного исследования можно сделать вывод, что по совокупности полученных экспериментальных данных установлено, что наиболее подходящим

углеводным компонентом в питательной среде для продуцента низкомолекулярных бактериостатических соединений *T. atrobrunneum* является сахароза. Можно предположить, что она имеет наибольшее сродство с сахаролитическим комплексом гриба ($K_s=0,202\pm 0,18$ г/л; $\mu_{max}=0,089\pm 0,01$ ч⁻¹); в то время как сродство остальных углеводов уменьшается в порядке: лактоза > фруктоза > глюкоза.

В присутствии сахарозы рост биомассы мицелия идет быстрее: время генерации сокращено на 27,34%, метаболический коэффициент выше среднего на 74,79%.

K_s (субстратная константа) и μ_{max} (удельная максимальная скорость) являются наиболее существенными параметрами, характеризующими рост микроорганизмов в периодической культуре. Они позволяют прогнозировать, насколько устойчиво будет идти культивирование и насколько полно компонент может быть извлечен из среды микробным продуцентом с максимальным выходом целевого продукта.

Таким образом, в целом нами математически обосновано оптимальное использование *T. atrobrunneum* в качестве углеводного компонента питательной среды сахарозы.

Литература

1. Алимova Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. — Казань: Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, 2006. — 210 с.
2. Кувариha А.Е., Кураков А.В., Садыкова В.С., Громоных Т.И. Нерибосомальные пептиды грибов: биологическая активность и перспективы в медицине // Проблемы медицинской микологии. — 2016. — № 3. — С. 4–11.
3. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. — М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. — 528 с.
4. Садыкова В.С., Кураков А.В., Коршун В.А., Рогожин Е.А., Громоных Т.И., Кувариha А.Е., Баранова А.А. Антимикробная активность штамма *T. citrinoviride* ТУVI 4/11 — продуцента пептаиболов в условиях жидкофазного и твердофазного культивирования // Антибиотики и химиотерапия. — 2015. — № 11. — С. 3–8.
5. Садыкова В.С., Кураков А.В., Кувариha А.Е., Тюрин А.П., Рогожин Е.А., Коршун В.А. Образование штаммом *Trichoderma citrinoviride* ТУVI 4/11 антибиотиков-пептаиболов // Проблемы медицинской микологии. — 2015. — № 1. — С. 41–46.
6. Daniel F. de S.J. Peptaibols from *Trichoderma* // Nat. Prod. Rep. — 2007. — Vol. 24. — P. 1128–1141.
7. Mukherjee P.K., Horwitz B.A., Kenerley C.M. Secondary metabolism in *Trichoderma* — a genomic perspective // Microbiology. — 2012. — Vol. 158(Pt 1). — P. 35–45.
8. Rubio M.B., Hermosa R., Reino J.L., Collado I.G., Monte E. Thctf1 transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity // Fungal Genet. Biol. — 2009. — Vol. 46(1). — P. 17–27.
9. Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., et al. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma* // Acta Microbiol. Immunol. Hung. — 2005. — Vol. 52(2). — P. 137–168.
10. Zhu F., Chen Y., Cui C. et al. Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting // Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. — 2011. — Vol. 108(31). — P. 12943–12948.

MATHEMATICAL JUSTIFICATION FOR OPTIMAL GROWTH OF *TRICHODERMA ATROBRUNNEUM* ON A NUTRIENT MEDIUM WITH VARIOUS CARBOHYDRATE COMPONENTS

I.A. GNEUSHEVA, A.V. LUSHNIKOV, N.E. PAVLOVSKAYA, O.A. MARKINA

N.V. Parakhin Orel State Agrarian University, Orel

The intensity of the biosynthesis of microbial metabolites depends on the rate of consumption of carbohydrates by the producer from the nutrient medium. Favorable conditions for biosynthetic activity are provided by the rapid growth of producer mycelium in the first phase of fermentation, followed by its slowdown. The study showed by mathematical calculations that for the optimal growth of the producer of *T. atrobrunneum* bacteriostatic metabolites, the carbohydrate component of the nutrient medium, sucrose, is the most significant; 79% of the average. K_s (substrate constant) and μ_{max} (specific maximum speed) are the most important parameters characterizing the growth of microorganisms in a periodic culture. They allow to predict how stable cultivation will go and how fully a component can be extracted from the medium by a microbial producer with the maximum yield of the target product.

Keywords: *Trichoderma atrobrunneum*, bacteriostatic metabolites, sucrose, growth kinetics, substrate constant, specific maximum speed.

ПРИМЕНЕНИЕ ИННОВАЦИОННОГО БИОСОРБЕНТА НА ОСНОВЕ ОТХОДОВ ЛЕСОПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА ДЛЯ ОЧИСТКИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ВОД

Т.Н. ЩЕМЕЛИНИНА*, Ж.Т. ПАНТЮХИНА, Д.В. ТАРАБУКИН,
Е.М. АНЧУГОВА, В.В. ВОЛОДИН

ФГБУН Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар

В данной статье предложен способ утилизации отходов лесопромышленного производства (обезвоженного осадка активного ила) с использованием биотехнологий, принципиально отличающийся от применяемых ранее на предприятиях. Исследована возможность использования модифицированного обезвоженного осадка активного ила в качестве носителя для получения инновационного Биосорбента для нефтезагрязненных сред, где биологическим агентом является иммобилизованный на нем консорциум микроорганизмов-нефтедеструкторов. Показано, что снижение сорбции нефтепродуктов Биосорбентом в 1,1–1,3 раза по сравнению с Сорбентом (обезвоженным осадком активного ила) обусловлено увеличением гидрофильности носителя в процессе иммобилизации. При этом эффективность нефтедеструкции в 1,4–1,5 раза выше при использовании разработанного Биосорбента за счет самоочищения системы микроорганизмами.

Ключевые слова: нефтезагрязненная вода, отход лесопромышленного производства, обезвоженный осадок активного ила, микроорганизмы-нефтедеструкторы, сорбция, деструкция нефтепродуктов.

Введение

Углеводородное загрязнение на сегодняшнее время занимает одно из первых мест по опасности воздействия на окружающую среду. Годовой объем нефтяных загрязнений в России оценивается в размере 10–12 млн. тонн [2]. Мировой опыт по ликвидации аварийных разливов на водной и грунтовой поверхностях, утилизации нефтяных шламов все больше свидетельствует о преимуществе сорбционных методов, которые позволяют оперативно и с меньшими затратами осуществлять сбор и переработку нефти и нефтепродуктов. Для утилизации нефтепродуктов используют разнообразные сорбенты как природные, так и синтетические. Однако их производство связано с дополнительными материальными и энергетическими затратами. Актуальным для решения этой проблемы является поиск материалов, накапливающихся в значительном количестве в виде отходов различных производств. В России сосредоточены крупнейшие запасы лесных

ресурсов. По запасам древесины Российская Федерация (81,5 млрд. куб. м) занимает второе место в мире после Бразилии (126,2 млрд. куб. м) [3]. Отходы образуются на всех стадиях лесопромышленного производства (лесо-заготовительного и деревообрабатывающего). Основные виды отходов: опилки, кора, щепа, лигнин, активный ил, сточные воды и др. Использование отходов возможно как в исходном виде, например, опилки, щепа, так и при модификации отхода, например, илы очистных сооружений, полимерные материалы и т.д. Использование отходов в исходном виде значительно упрощает получение биосорбента, однако при модификации отхода гарантируется экологическая безопасность получаемого материала, то есть отсутствие болезнетворных бактерий, тяжелых металлов и др. Под модификацией отходов понимается трансформация материала различным способом, а именно: механическим, термическим или химическим. Способ выбирается в зависимости от применяемого отхода.

Обезвоженный осадок активного ила представляет собой избыток искусственно выращенного биоценоза при аэрации антропогенно загрязненных вод, а после термической модификации и высушивания — гидрофобный сорбент [8]. Использование обезвоженного осадка активного ила с иммобилизованными биологическими агентами для сорбции нефтепродуктов и последующей их деструкции является перспективным направлением в биотехнологии очистки от углеводородных загрязнений.

© 2018 г. Щемелинина Т.Н., Пантюхина Ж.Т., Тарабукин Д.В., Анчугова Е.М., Володин В.В.

* Автор для переписки:

Щемелинина Татьяна Николаевна

старший научный сотрудник, канд. биол. наук

ФГБУН Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН

E-mail: tatyanakomi@mail.ru

Цель работы состояла в оценке эффективности инновационного биосорбента на основе отхода лесопромышленного производства — обезвоженного осадка активного ила в биотехнологии очистки нефтезагрязненных водных объектов.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись биосорбент на основе модифицированного обезвоженного осадка активного ила с иммобилизованными на нем нефтеокисляющими микроорганизмами и модельная вода, загрязненная нефтью.

Активный ил — биоценоз, населенный гелепродуцирующими бактериями-гетеротрофами, хемотрофами, простейшими и многоклеточными животными. С помощью активного ила происходит биологическая очистка в аэротенках очистных сооружений предприятий. В процессе очистки образуется избыточное количество активного ила, который идет на обезвоживание и дальнейшую утилизацию на полигон отходов (обезвоженный осадок активного ила). В качестве Сорбента нами был использован отход производства АО «Монди СЛПК» — обезвоженный осадок активного ила, ежегодное образование которого составляет около 50 тысяч тонн [1].

Штамм *Rhodotorula glutinis* выделен из нефтешлама шламонакопителя Усинского района Республики Коми, способный к нефтеокислению. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Г.К. Скрыбина. Штамму присвоен номер VKM Y-2998D. В классификации микроорганизмов по группам патогенности Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 данный вид не значится.

Штамм бактерий *Pseudomonas yamanorum* выделен из загрязненного грунта, отобранного с участка железнодорожного полотна в г. Сыктывкаре Республики Коми, способный активизировать биодеструкцию нефти и нефтепродуктов в воде, в дерново-подзолистой почве, а также в техногенных грунтах на участках железной дороги. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Г.К. Скрыбина. Штамму присвоен номер VKM B-3033D. В классификации микроорганизмов по группам патогенности Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 данный вид не значится.

Штамм микроводоросли *Chlorella vulgaris f. globosa* выделен в 2010 году из почвы на стоянке оленеводов в Приполярном Урале, способен к нефтеокислению.

Штамм депонирован в Коллекции микроорганизмов Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Штамму присвоен номер SYKO A Ch-011-10.

Конструирование Биосорбента

Обезвоженный осадок активного ила модифицировали с помощью стерилизации при температуре 121 °С и давлении 1,8 бар в течение 20 минут для инактивации патогенной микрофлоры (Сорбент).

Суспензии клеток биологических агентов готовили в условиях жидкофазной ферментации при 180 об./мин, комнатной температуре и естественном освещении в течение 3–7 суток. Среда для культивирования дрожжей *Rhodotorula glutinis* следующего состава: на 1 дм³ воды — сахароза — 20 г; NaNO₃ — 3,0 г; KH₂PO₄ — 1,0 г; KCl — 0,5 г; MgSO₄×5H₂O — 0,5 г. Среда для культивирования бактерий *Pseudomonas yamanorum*: на 1 дм³ воды — пептон — 20 г; NaCl — 3,0 г; KCl — 1,0 г; MgSO₄×7H₂O — 0,5 г. Среда для культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris f. globosa*: на 1 дм³ воды — KNO₃ — 5,0 г, MgSO₄×7H₂O — 2,5 г; KH₂PO₄×3H₂O — 1,25 г; FeSO₄ — 0,003 г.

На модифицированный носитель наносили суспензии микроорганизмов-нефтедеструкторов, взятые в эффективных количествах в соотношении 1 часть суспензии к 10 частям носителя. Биосорбент высушивали при температуре 23–27 °С.

Оценка сорбционных и деструктивных способностей Биосорбента по результатам модельных экспериментов

Модельный эксперимент 1

В экспериментальные стаканы на 250 см³ наливали 100 см³ водопроводной воды, добавляли 50 мг нефти, вносили обезвоженный осадок активного ила — Сорбент и Биосорбент. Сорбция нефтепродуктов происходила в течение 1–2 минут. Эксперимент проводили в трех вариантах.

Для оценки удержания сорбированных нефтепродуктов Сорбентом и Биосорбентом применяли лабораторную модель маслоуловителя (рис. 1). В проточную ячейку на поверхность воды помещали несколько капель нефтепродуктов таким образом, чтобы они были выше выходящего отверстия маслоуловителя. После этого помещали навеску Сорбента либо Биосорбента из соотношения 1:3 по отношению к внесенным нефтепродуктам. Далее в течение суток с помощью перистальтического насоса поддерживали непрерывное циклическое движение воды через ячейку. По окончании измеряли остаточное количество нефтепродуктов, связанное сорбирующими материалами в ячейке.



Рис. 1. Лабораторная модель маслоуловителя

Модельный эксперимент 2

В экспериментальные колбы на 250 см³ наливали дистиллированную воду по 100 см³, минеральные соли (NaNO₃, MgSO₄, KCl, KH₂PO₄) и сахарозу, стерилизовали и добавляли по схеме опыта нефть (табл. 1), Сорбент, Биосорбент. По окончании эксперимента (через 7 суток) определяли остаточное содержание нефтепродуктов (НП) как в воде, так и в самой биомассе Сорбента и Биосорбента.

Таблица 1

Схема модельного эксперимента 2

| Вариант | Среда эксперимента | Внесенный агент |
|---------|---|---------------------------|
| 1 | Дистиллированная вода, | отсутствует (Контроль) |
| 2 | минеральные соли, | Сорбент |
| 3 | нефть 5 см ³ /100 см ³ воды | Биосорбент |

Модельный эксперимент 3

Сорбент и Биосорбент вносили в загрязненную НП водопроводную воду. Образцы экспонировали при комнатной температуре и естественном освещении в течение 21 суток. По окончании эксперимента анализировали остаточное содержание НП в незагрязненном обезвоженном осадке активного ила и в биомассе Сорбента и Биосорбента.

Массовую концентрацию НП в образцах определяли гравиметрическим методом, ПНД Ф 14.1:2.116-97 [6].

Для этого из навески образца последовательно делали серию экстракций НП хлороформом до достижения прозрачного раствора. Далее из полученного экстракта на водяной бане посредством холодильника ХПТ пере-

гоняли избыток хлороформа до 20 см³ жидкости. Оставшуюся часть экстракта выветривали в вытяжном шкафу до постоянной массы сухого остатка. Затем полученный сухой остаток экстрагировали гексаном и полученный раствор вносили на хроматографическую колонку, заполненную 6 граммами оксида алюминия. Колонку перед внесением экстракта предварительно промывали 10 см³ чистого гексана. Объем гексана, затраченного на экстракцию сухого остатка, составлял 40 см³. Полученный элюат собирали в предварительно взвешенные бюксы и выветривали в вытяжном шкафу до постоянной массы. Разница между массой пустого бюкса и бюкса с сухим остатком принималась за значение НП.

Флуоресцентные фотографии получали с помощью микроскопа Axiovert 200 M, снабженного цифровой камерой AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss, Германия), ×100. Образцы для флуоресцентной микроскопии окрашивали акридиновым оранжевым, далее промывали дистиллированной водой через насадку, снабженную микропористой мембраной 0,25 мкм.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Флуоресцентная микроскопия продемонстрировала наличие в структуре Сорбента достаточно крупных фрагментов, которые могут представлять собой отмершие оболочки флоккул, а также мелкое волокно с целлюлозно-бумажного производства (рис. 2А). Исследование Биосорбента выявило скопления бактерий в объеме носителя, а также единичные клетки дрожжей. Таким образом, состав и структура обезвоженного осадка активного ила позволяют использовать его в качестве эффективного носителя для закрепления целевых микроорганизмов-нефтедеструкторов (рис. 2Б).

Первичная оценка сорбционной способности выявила, что как Сорбент, так и Биосорбент в течение 1–2 минут связывают нефтепродукты на водной поверхности (рис. 3). Так как обезвоженный осадок активного ила является гидрофобным, а предельные углеводороды практически электронейтральны, то возможно предположить, что, помимо физической адсорбции, происходит гидрофобное взаимодействие частиц НП и Сорбента или Биосорбента [4, 5]. Поскольку сродство гидрофобных частиц к воде меньше, чем между собой, то Сорбент или Биосорбент и НП соединяются в глобулы, вследствие чего и происходит эффективное удаление НП из воды.

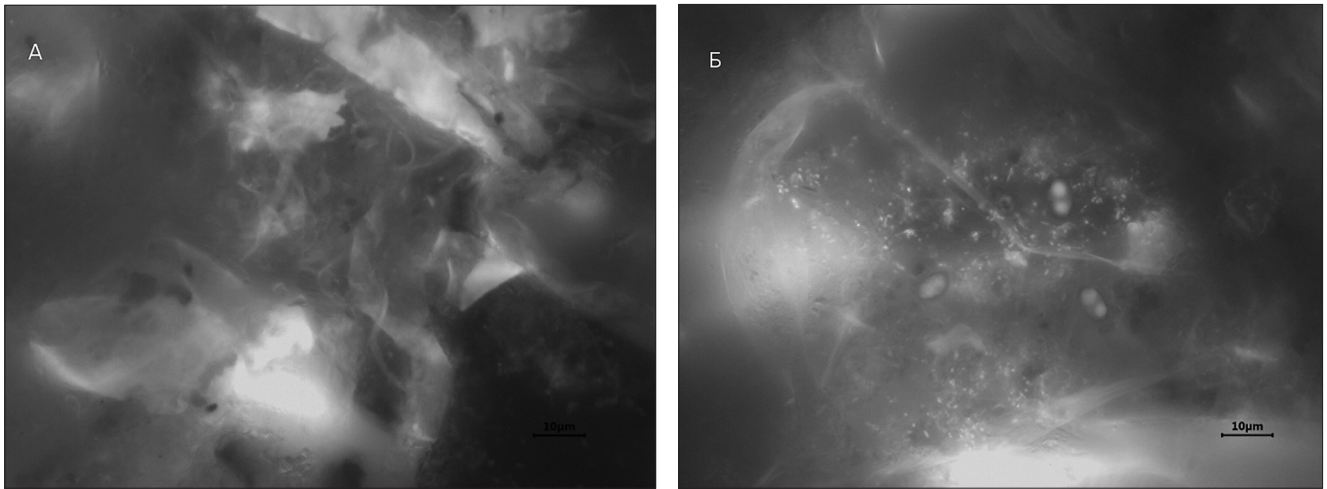


Рис.2. Микрофотография (увеличение $\times 100$). Сорбент (А), Биосорбент (Б).

В модельном эксперименте 1 выявлено, что степень удержания нефти массой Сорбента в маслоуловителе составила 86–97%, а Биосорбента – 68–89% (табл. 2).

В модельном эксперименте 2 эффективность сорбции Сорбентом составила 91%, Биосорбентом – 80% (табл. 3). При обработке обезвоженного осадка актив-

ного ила альго-бактериально-дрожжевым консорциумом повышается гидрофильность носителя и, как следствие, происходит снижение сорбционных свойств Биосорбента (см. табл. 2, 3), что может быть объяснено отложением солей питательной среды, а также самих клеток биологических агентов на поверхности гидрофобного носителя.

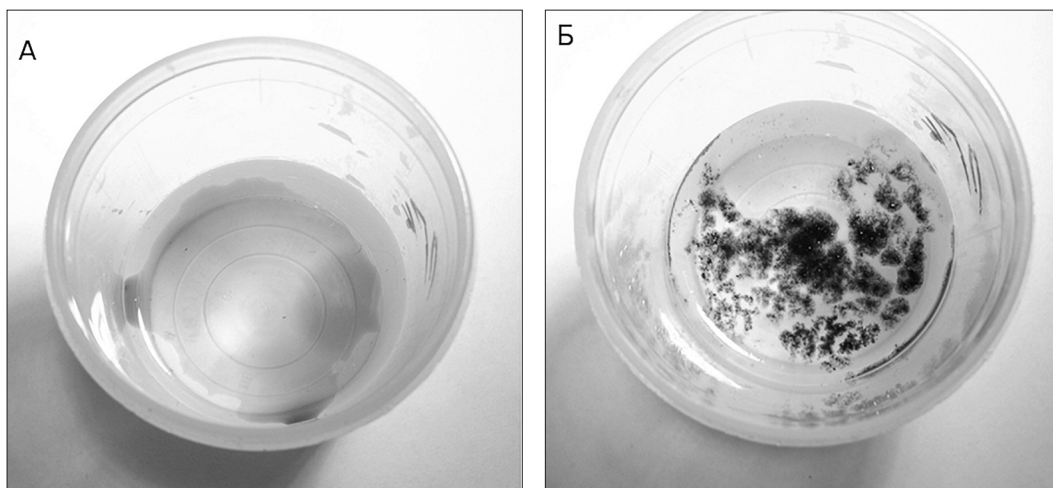


Рис. 3. Сорбция нефти Биосорбентом: А) пятно нефти на поверхности воды; Б) Биосорбент, внесенный на пятно нефти

Кроме того, одной из вероятных причин снижения сорбционной емкости может являться уменьшение пористости Биосорбента за счет слипания отдельных частиц при нанесении суспензии [7]. В то же время при суммировании количественного содержания остаточных углеводородов в модельной воде и образовавшейся биопленке степень разложения НП выше в варианте с внесением Биосорбента и в целом составляет 18% от исходного загрязнения (см. табл. 3). В варианте с внесением Сорбента степень очистки в 1,4 раза ниже и составляет 13% от контроля, что говорит о деструктивной способности по отношению к НП иммобилизо-

ванного на сорбенте альго-бактериально-дрожжевого консорциума. В модельном эксперименте 3 произошла сорбция НП Сорбентом и Биосорбентом, образовалась биопленка, которая за период эксперимента в образце Биосорбента увеличилась в объеме в 3 раза (рис. 4). В биомассе образовавшихся биопленок определяли содержание НП (табл. 4). Эффективность очистки от НП в биомассах Сорбента и Биосорбента спустя 21 сутки составила 64 и 96%, соответственно. Таким образом, разложение углеводородов нефти происходит активнее в биомассе с иммобилизованными микроорганизмами-нефтедеструкторами.

Таблица 2

Эффективность сорбции нефтепродуктов с помощью Сорбента и Биосорбента в ячейке

| № | Образец | Содержание НП в вариантах эксперимента, г/дм ³ |
|---|------------------------------------|---|
| 1 | Контроль (загрязненная НП вода) | 36,0±4,0 |
| | | 34,0±3,0 |
| | | 37,0±4,0 |
| 2 | Вода после сорбции НП Сорбентом | 1,2±0,12 |
| | | 3,5±0,4 |
| | | 4,8±0,5 |
| 3 | Вода после сорбции НП Биосорбентом | 11,0±1,1 |
| | | 3,8±0,4 |
| | | 6,4±0,6 |

Таблица 3

Эффективность сорбции и биодеструкции нефтепродуктов с помощью Сорбента и Биосорбента

| Образец | Содержание НП, г/дм ³ |
|--|----------------------------------|
| Контроль (модельная вода, загрязненная нефтью) | 35,7±4,0 |
| Сорбент | |
| Вода | 3,2±0,3 |
| Биопленка | 27,9±3,0 |
| Биосорбент | |
| Вода | 7,1±0,7 |
| Биопленка | 22,1±2,0 |

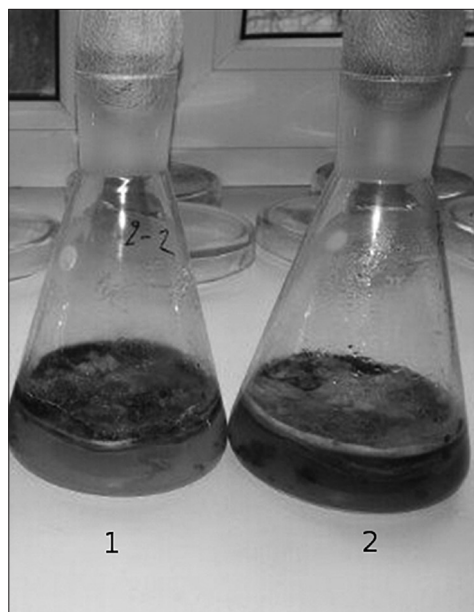


Рис. 4. Модельный эксперимент 3. Образование биопленки: 1 – Сорбент, 2 – Биосорбент

Таблица 4

Эффективность биодеструкции нефтепродуктов с помощью Сорбента и Биосорбента за 21 сутки

| № | Образец | Содержание НП в начале эксперимента, г/кг | Содержание НП спустя 21 сутки, г/кг |
|---|---|---|-------------------------------------|
| 1 | Положительный контроль (незагрязненный обезвоженный осадок активного ила) | 0,056 | |
| 2 | Сорбент + НП | 3,1±0,3 | 1,1±0,1 |
| 3 | Биосорбент + НП | 15,0±0,2 | 0,6±0,06 |

Заключение

Разработан инновационный биосорбент на основе модифицированного обезвоженного осадка активного ила – отхода лесопромышленного производства с иммобилизованными на нем клетками микроорганизмов-нефтедеструкторов *Rhodotorula glutinis* VKM Y-2998D, *Pseudomonas yamanorum* VKM B-3033D, *Chlorella vulgaris* f. *globosa* SYKO A Ch-011-10. Эффективность сорбции НП Биосорбентом составила 89%. Эффективность нефтедеструкции с помощью Биосорбента за 21 сутки составила 96%.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания «Разработка биокаталитических систем на основе ферментов, микроорганизмов и растительных клеток, их иммобилизованных форм и ассоциаций для переработки растительного сырья, получения биологически активных веществ, биотоплива, ремедиации загрязненных почв и очистки сточных вод», № АААА-А17-117121270025-1.

Литература

1. Аликбаева Л.А., Сидорин Г.И., Луковникова Л.В., Рыжков А.Л., Фомин М.В., Бек А.В. Токсичность и опасность отходов очистных сооружений урбанизированных территорий // Казанский медицинский журнал. – 2009. – № 4. – С. 509–513.
2. Анализ ситуации загрязнения окружающей среды нефтепродуктами [Электронный ресурс]: <http://www.expertyug.ru/analitics/33-analiz-situacii-zagrzaznenija/>.

3. Андреев А.А. Ресурсосбережение и использование отходов заготовки и переработки древесного сырья // *Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты*. — 2014. — № 10. — С. 148–155.
4. Благодырёва А.М., Свергузова С.В. Очистка нефте-содержащих сточных вод как способ снижения индекса загрязнённости водных объектов // *Вестник Тульского государственного университета. Серия «Экология и безопасность жизнедеятельности*. — 2009. — Вып. 3. — С. 27–33.
5. Благодырёва А.М. К вопросу очистки нефтесодержащих сточных вод / В кн.: *Научные исследования, наносистемы и ресурсосберегающие технологии в стройиндустрии: сб. докл. Междунар. науч.- практ. конф.* — Белгород: Изд-во БГТУ им. В.Г. Шухова, 2007. — С. 17–18.
6. Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах вод методом колоночной хроматографии с гравиметрическим окончанием. ПНД Ф 14.1:2.116-97, 1997.
7. Рябухина К.С., Злобина К.А., Рудакова Л.В., Белик Е.С. Биосорбент для очистки воды от нефти и нефтепродуктов / В кн.: *Модернизация и научные исследования в транспортном комплексе*. — Пермь, 2015. — С. 288–292.
8. Солодкова А.Б. Обезвреживание отработанного активного ила с получением материалов для решения экологических проблем химических и нефтехимических предприятий: дис. канд. техн. наук. — Саратов, 2014. — 160 с.

APPLICATION OF INNOVATIVE BIOSORBENT BASED ON PULP AND PAPER INDUSTRY WASTES FOR THE PURIFICATION OF THE OIL-POLLUTED WATERS

T.N. SHCHEMELININA, Zh.L. PANTYUHINA, D.V. TARABUKIN,
E.M. ANCHUGOVA, V.V. VOLODIN

Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS, Syktyvkar

The method of pulp and paper industry wastes (the dried sludge) using the biotechnology distinguished from the applied ones is offered in this article. The possibility of usage of the modified dried sludge as the carrier for innovative Biosorbent for the oil-polluted environments with a consortium of hydrocarbon-oxidizing microorganisms immobilized as biological agent is researched. It is shown that decrease of oil hydrocarbon sorption by Biosorbent by 1.1–1.3 times in comparison by the Sorbent (the modified dried sludge itself) is caused by increase in wetting ability of the carrier during immobilization. At the same time oil degradation efficiency is 1.4–1.5 times higher in case of Biosorbent developed due to self-purification of system by microorganisms.

Keywords: oil-polluted water, dried sludge, hydrocarbon-oxidizing microorganisms, sorption, oil degradation.

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И СПЕЦИФИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ГИАЛУРОНИДАЗЫ ИЗ СЕМЕННИКОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Я.В. МЕЛЬНИКОВА*, Н.В. ГЛАЗОВА

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия

С помощью современных методов проведен анализ физико-химических свойств и специфичности гиалуронидазы из семенников крупного рогатого скота (КРС) с различной степенью очистки. Показано, что экстракт семенников КРС, стандарты и препараты гиалуронидазы имеют сложный белковый состав; фермент гиалуронидаза обладает свойством полиморфизма, чувствителен к температуре. Показано увеличение специфичности фермента в лекарственном препарате по сравнению с его специфичностью в экстракте.

Ключевые слова: гиалуронидаза, стандарт, высокоэффективная жидкостная хроматография, модельный раствор, субстрат-специфичность.

Введение

Гиалуронидаза — фермент, расщепляющий кислые мукополисахариды, составляющие основу соединительной ткани. Она содержится в семенниках и в сперме млекопитающих, молоках рыб, в лизосомах клеток различных тканей (например, печеночной), в некоторых физиологических жидкостях (например, сыворотка крови), в слюне и слюнных железах млекопитающих, в пчелином и змеином ядах [3]. Однако наиболее распространенным сырьем при получении лекарственных препаратов являются семенники крупного рогатого скота в связи с доступностью и низкой стоимостью.

Особенностью белков, особенно ферментов, является большая лабильность, легкая изменяемость свойств в зависимости от условий среды (рН, температуры, наличия активаторов и ингибиторов) и др. Это требует проведения процессов при оптимальных условиях. Поэтому выявление физико-химических свойств объектов, с которыми ведется работа, представляется приоритетной задачей.

Целью настоящей работы было изучение физико-химических свойств гиалуронидазы из семенников КРС для выбора эффективного метода очистки при разработке технологии, а также определение специфичности при разных степенях очистки.

Материалы и методы

1. Материалы исследования

1.1. *Biological Reference Preparation (BRP)* гиалуронидазы (стандарт Европейской Фармакопеи).

1.2. *Экстракт семенников КРС.* Для приготовления экстракта сырье (семенники КРС) измельчали на мясорубке, добавляли двукратный объем экстрагента (раствор уксусной кислоты). Длительность экстракции составляла $2 \pm 0,5$ ч, экстракцию вели при постоянном перемешивании и температуре не выше $+10$ °С. Жмых отделяли на стаканчиковой центрифуге.

1.3. *Модельный раствор гиалуронидазы.* Для приготовления модельного раствора гиалуронидазы использовали субстанцию «Лидаза» в форме лиофилизата производства компании ООО «Самсон-Мед».

1.4. *Препараты «Лидаза»* — лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения производства компании ООО «Самсон-Мед» и «Лидаза-Белмед» — порошок лиофилизированный для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения» производства РУП «Белмед-препараты».

2. Методы

2.1. *Метод определения белка с использованием биуретового реактива* [1]. К 1,0 мл испытуемого раствора (разбавленного до содержания белка в 1 мл от 1 до 10 мг) приливали 4,0 мл биуретового реактива. Содержимое пробирки перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30 минут. Измерение проводили относительно контроля, в качестве которого использовали пробу, содержащую 1,0 мл воды и 4,0 мл биуретового

реактива. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре при длине волны $\lambda=600$ нм. По калибровочному графику, построенному по сывороточному альбумину, определяли количество белка, соответствующее данной оптической плотности. Этот график представлен на рисунке 1.

2.2. Метод определения гиалуронидазной активности. В 2 пробирки вносили по 0,1 мл раство-

ра исследуемого образца, затем по 0,2 мл ацетатного буферного раствора (рН 4,0). В 3-ю пробирку (контроль) вносили 0,3 мл ацетатного буферного раствора (рН=4,0). Пробирки помещали в термостат (температура $37\pm 0,1$ °С) и выдерживали в течение 5 мин, затем во все пробирки последовательно через каждые 30 сек. вносили по 0,2 мл раствора субстрата (гиалуроновая кислота или ее соль).

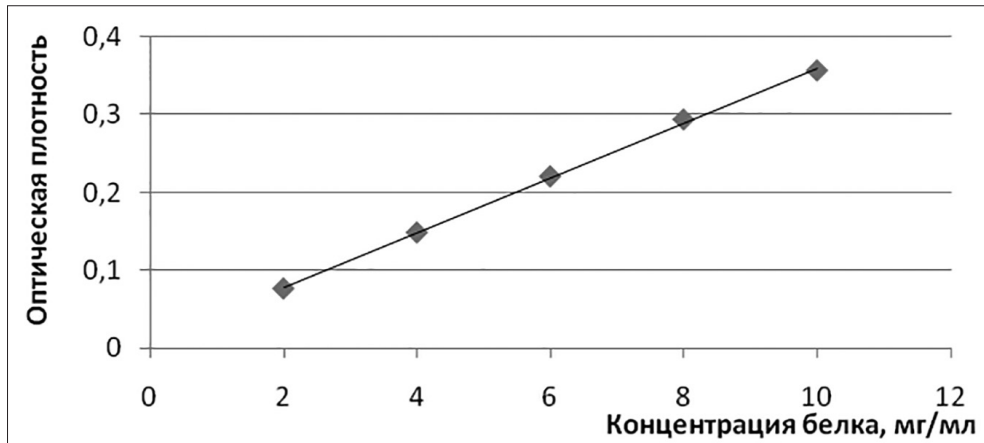


Рис. 1. Калибровочная кривая для определения количества белка по биуретовому методу

Смесь инкубировали в течение 15 мин в термостате (температура $37\pm 0,1$ °С). После инкубации все пробирки помещали в баню со льдом на 5 мин. В охлажденные пробирки последовательно через каждые 30 сек. вносили рассчитанное по титру количество 0,8 М раствора тетрабората калия и помещали их в кипящую водяную баню на 3 мин. Затем пробирки помещали в баню со льдом на 5 мин.

В охлажденные пробирки вносили по 3 мл разведенного реактива Эрлиха и инкубировали в термостате

(температура $37\pm 0,1$ °С) в течение 20 мин. После инкубации пробы охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 586 нм.

По калибровочному графику, построенному по стандартному образцу гиалуронидазы, определяли гиалуронидазную активность в растворе, соответствующую данной оптической плотности. Полученный график представлен на рисунке 2.

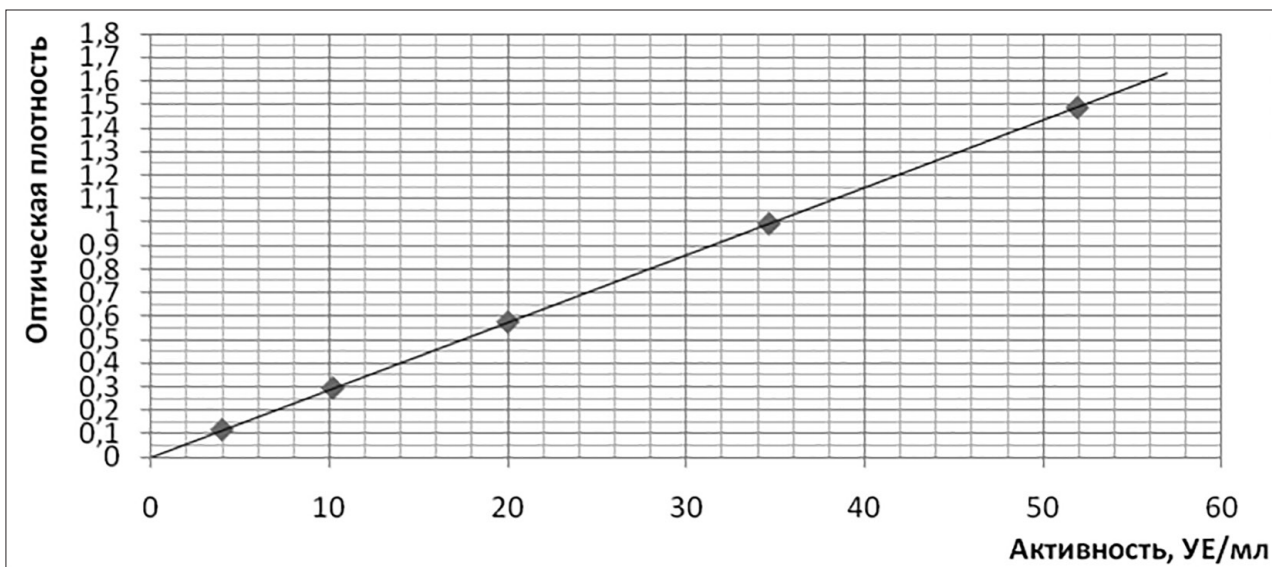


Рис. 2. Калибровочная кривая для определения гиалуронидазной активности в растворе

Гиалуронидазную активность (X) в 1 мг белка в УЕ вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A}{C}, \text{ УЕ/мг,}$$

где A — гиалуронидазная активность в растворе, УЕ/мл;

C — концентрация общего белка в растворе, измеренная биуретовым методом, мг/мл.

2.3. Метод определения специфичности

Для определения специфичности реакций использовали константу Михаэлиса — Ментен (K_m), характеризующую сродство фермента к субстрату.

Для определения максимальной удельной скорости измеряли активность гиалуронидазы через определенные промежутки времени до полного завершения реакции, когда активность не зависела от скорости проведения реакции и оставалась постоянной.

Удельную скорость реакции рассчитывали по формуле:

$$V_{\text{уд}} = (-2,303 \cdot E_f \cdot \lg(E_f - E_t) \cdot M) / (E_t \cdot t \cdot C),$$

где $V_{\text{уд}}$ — удельная скорость образования комплекса фермент/субстрат, мкмоль/мин;

E_f — оптическая плотность в точке экстинкции;

E_t — оптическая плотность при $t=1$ мин;

M — молекулярная масса гиалуроновой кислоты, кДа ($M=600$ кДа);

C — концентрация общего белка в растворе, мг/мл;

t — время полного завершения реакции, 25 мин.

Для определения кинетических параметров реакции строили график зависимости удельной скорости реакции v [(мкмоль/мин)⁻¹] от концентрации субстрата S [мг/мл], который представляет собой отрезок гиперболы. По графику определяли максимальную удельную скорость реакции v_{max} .

Численно константа Михаэлиса — Ментен K_m [мг/мл] равна такой концентрации субстрата, при которой начальная скорость ферментативной реакции составляет половину максимальной скорости. Для практического определения кинетических параметров этот график неудобен, к тому же требует использования концентраций субстрата, «насыщающих» фермент, что не всегда достижимо при ограниченной растворимости субстрата [4].

Поэтому преобразовали уравнение Михаэлиса — Ментен в такую форму, чтобы графически оно изобра-

жалось прямой линией и для определения константы Михаэлиса — Ментен K_m [мг/мл] использовали метод двойных обратных величин Лайнуивера — Берка. Метод заключается в построении графика зависимости обратных величин скорости реакции и концентрации субстрата. K_m соответствует обратной величине, отсекаемой на оси абсцисс.

2.4. Методы определения белкового состава

2.4.1. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

2.4.1.1. Определение состава проводили методом эксклюзионной ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «СТАЙЕР» с использованием колонки BioSil SEC 250, 300×7,8 мм, производства компании «Bio-Rad». Элюирование осуществляли в изократическом режиме смесью уксусной кислоты ледяной, ацетонитрила и 0,1%-ного раствора L-лизина в соотношении 15:20:65 со скоростью потока 0,5 мл/мин. Детектирование проводили при длине волны 276 нм. Температура колонки и образца комнатная. Перед началом определения хроматографическую колонку промывали подвижной фазой до формирования стабильной базовой линии.

2.4.1.2. Определение состава проводили методом эксклюзионной ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «SHIMADZU» с использованием колонки BioSil SEC 250, 300×7,8 мм, производства компании «Bio-Rad». Элюирование осуществляли фосфатным буфером pH 6,8 со скоростью потока 0,5 мл/мин. Детектирование проводили при длине волны 276 нм. Температура колонки и образца комнатная. Перед началом определения хроматографическую колонку промывали подвижной фазой до формирования стабильной базовой линии.

2.4.2. Метод электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по Лэммли (SDSPAGE)

Электрофорез проводили в электрофоретической ячейке Bio-Rad Mini PROTEAN Tetra System методом разделения белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли. В качестве маркеров использовали стандарт SDS-PAGE-Standard Low Range компании «Bio-Rad».

Результаты и обсуждение

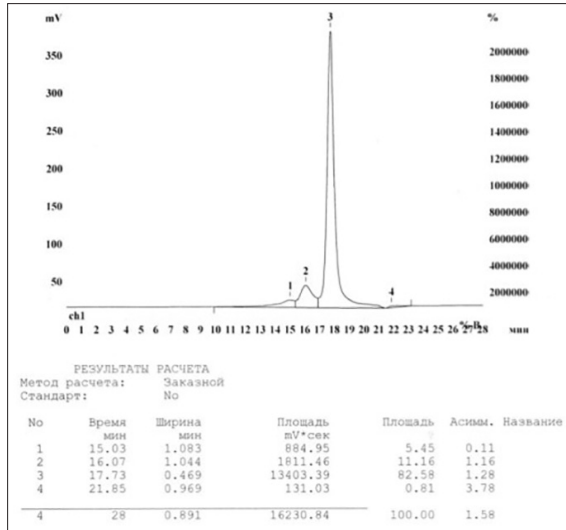
1. Определение молекулярной массы гиалуронидазы из семенников КРС

Провели анализ гиалуронидазы различной степени очистки методом эксклюзионной (гель-проникающей) жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в нормально-фазовом варианте.

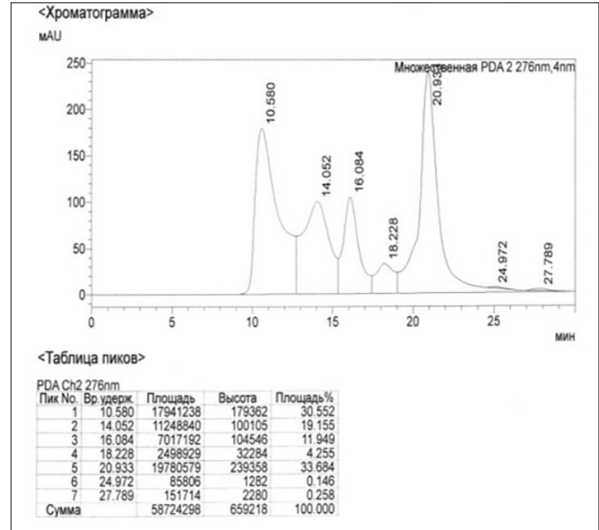
Для оценки распределения белкового состава изучаемых объектов по молекулярным массам по методу 2.4.1.1. провели анализ образца лиофилизата Цитохрома С, который имеет молекулярную массу 12,3 кДа. А по методу 2.4.1.2 провели анализ

стандарта гельфильтрации, выпускаемого компанией «Bio-Rad».

Хроматограммы Цитохрома С и стандарта гельфильтрации представлены на рисунке 3а и рисунке 3б соответственно.



(а)



(б)

Рис. 3. а) Хроматограмма раствора белка-маркера Цитохром С по методу 2.4.1.1.; б) Хроматограмма стандарта гельфильтрации по методу 2.4.1.2, включающего слева направо: тиреоглобулин (670 кДа), бычий гамма глобулин (158 кДа), овалбумин (44 кДа), миоглобин лошади (17 кДа), витамин В₁₂ (1,35 кДа)

Как видно из рисунка 3а, пик Цитохрома С выходит на 17–18 мин, значит пики, выходящие ранее 17–18 мин, будут иметь молекулярную массу более 12,3 кДа. На рисунке 3б показано, что пики, выходящие между 10 и 14 мин, будут иметь молекулярную

массу 670–158 кДа, между 14 и 16 мин– 158–44 кДа, между 16 и 18 мин – 44–17 кДа, между 18 и 21 мин – 17–1,35 кДа.

Хроматограмма по методу 2.4.1.1. экстракта семенников КРС представлена на рисунке 4.

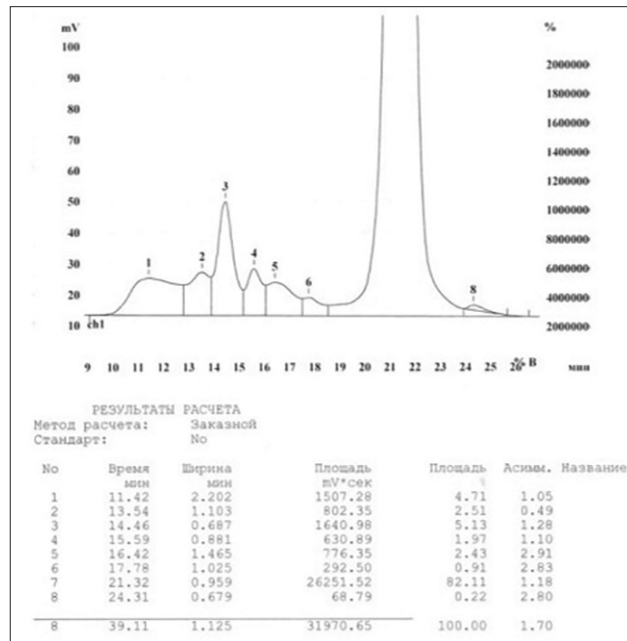
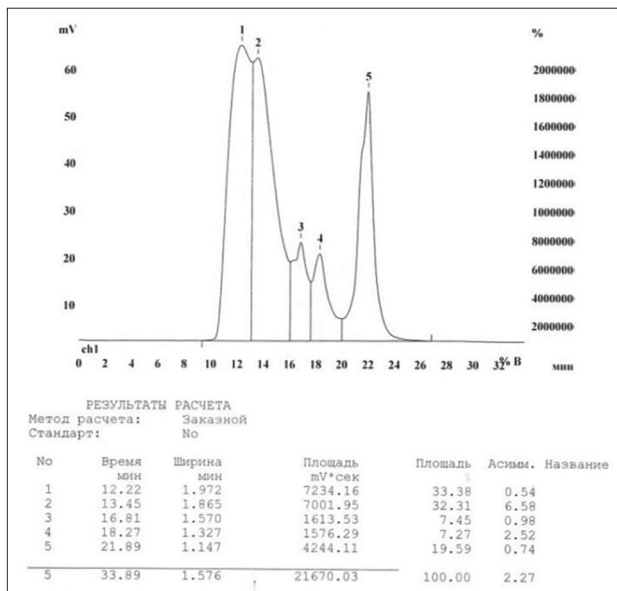


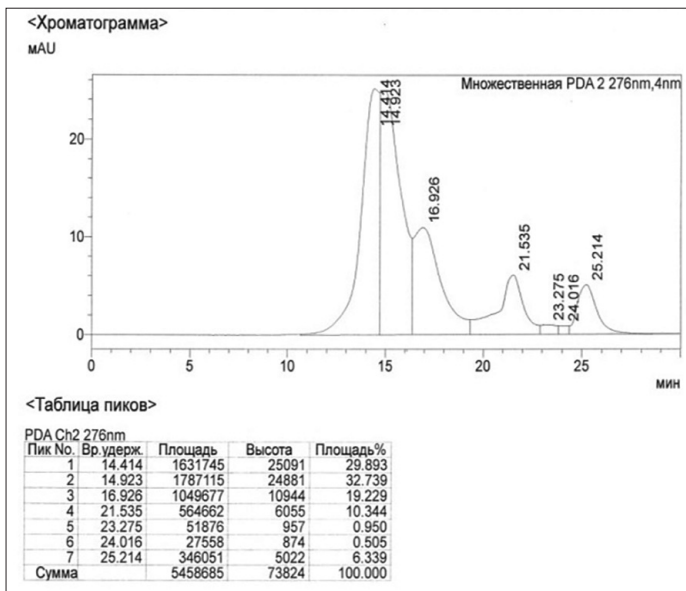
Рис. 4. Хроматограмма по методу 2.4.1.1. экстракта семенников КРС

Как видно из рисунка 4, экстракт содержит 5 пиков с молекулярной массой более 12 кДа (сравнение с цитохромом С), что говорит о том, что экстракт имеет сложный высокомолекулярный белковый состав.

На рисунке 5а, б и рисунке 6а, б соответственно представлены хроматограммы Международных стандартов гиалуронидазы ВРР (Европейской Фармакопеи) и Sigma.

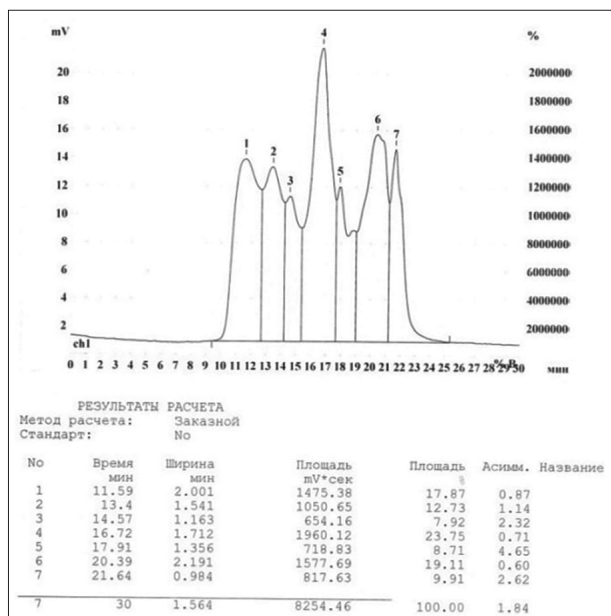


(а)

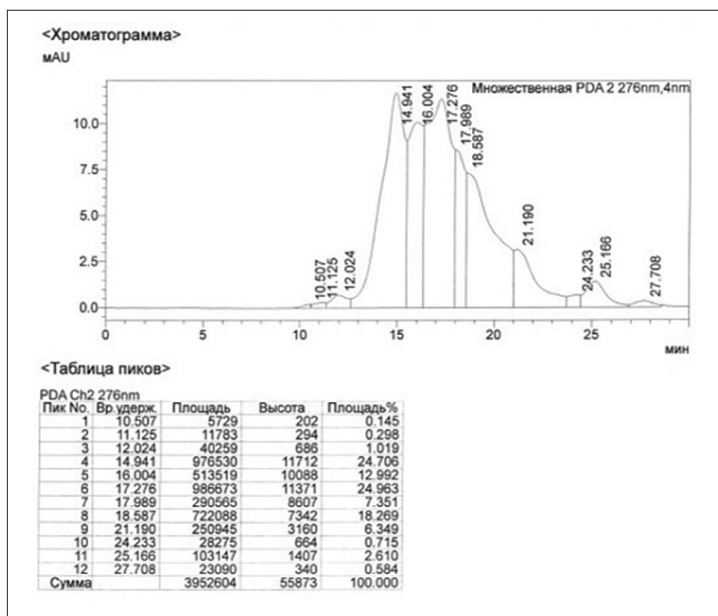


(б)

Рис. 5. Хроматограмма ВРР гиалуронидазы: (а) по методу 2.4.1.1., (б) по методу 2.4.1.2.



(а)



(б)

Рис. 6. Хроматограмма стандарта гиалуронидазы Sigma: (а) по методу 2.4.1.1., (б) по методу 2.4.1.2.

Как видно из рисунков 5 и 6, молекулярные массы белков в стандартах варьируют в диапазоне 158–17 кДа, также присутствуют низкомолекулярные белки.

На рисунке 7а и 7б представлены хроматограммы модельного раствора (субстанция «Лидаза» производителя ООО «Самсон-Мед») и препарата «Лидаза-Белмед» производителя РУП «Белмедпрепараты» соответственно.

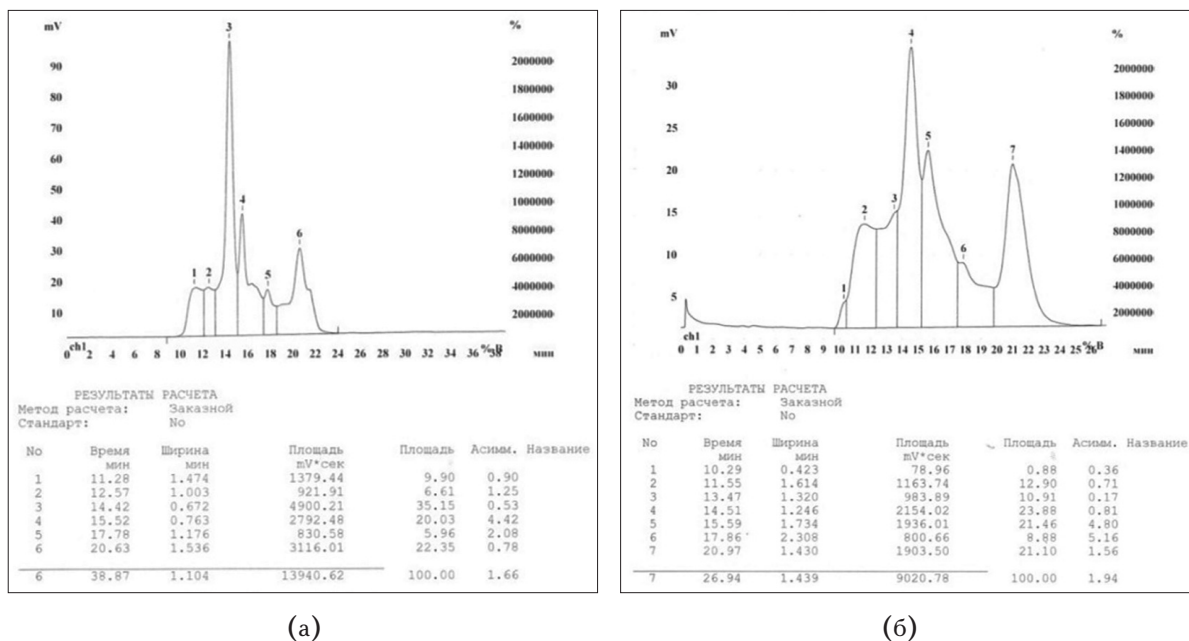


Рис. 7. Хроматограммы коммерческих препаратов: (а) — субстанция «Лидаза» производителя ООО «Самсон-Мед» и (б) — «Лидаза-Белмед» производителя РУП «Белмедпрепараты»

Как видно из представленных рисунков 4–7, экстракт семенников КРС, стандарты и препараты гиалуронидазы имеют сложный белковый состав.

Необходимо отметить расхождение в экспериментальных данных, представленных различными

исследователями. В таблице 1 сведены литературные данные, полученные исследователями при изучении гиалуронидазы 1 группы (типа) по классификации Карла Майера — тестикулярной гиалуронидазы или эндо-β-N-ацетилгексозаминидазы (гидролазы).

Таблица 1

Сводная таблица свойств гиалуронидазы (молекулярная масса, параметры энзиматической деятельности), представленных исследователями

| Источник фермента | Молекулярная масса, кДа | Метод определения молекулярной массы | Диапазон энзиматической деятельности (максимум) | | Авторы |
|-----------------------------------|--|---|---|--------------------|---------------------|
| | | | pH | Температура, °C | |
| Сперма барана, буйвола, быка | 89,6 и 81,2 (мономеры) | гель электрофорез SDS | — | — | R.A.P. Harrison [7] |
| | 62 | диск-гель электрофорез | 3,5–8,0 (3,8) | 60 мин при t 42 °C | C.-H. Yang [14] |
| Семенники крупного рогатого скота | 10,7 (протомер) | гель-фильтрация | 4,0–4,5 | 37–40 | Л.М. Игонина [2] |
| | Состоит из 4 субъединиц по 14 кДа каждая | метод Арчиальда (по скорости седиментации), диск-гель электрофорез, гель электрофорез SDS | — | — | A.Ya. Khorlin [10] |
| | ~55 | гель электрофорез SDS | — | — | M.O. Kaya [9] |
| | Имеет 2 формы — растворимую и мембранно-связанную (в диапазоне — 51,8–122 кДа) | гель электрофорез SDS с гиалуроновой кислотой (определение по гиалуроновой активности) | — | — | K. Mio [13] |
| | 60, 75 (растворимые белки) | гель электрофорез SDS | 4 | — | M.F. Meyer [12] |
| 61 (очищенная) 126 (экстракт) | гель-фильтрация (Sephadex G 100) | — | — | C.L. Borders [5] | |

Как видно из таблицы 1, молекулярная масса гиалуронидазы семенников КРС представлена следующими значениями: 52, 55, 56 (4 субъединицы по 14 кДа), 60, 61, 75.

Провели также анализ экстракта семенников КРС методом электрофореза в ПААГ. Электрофорез представлен на рисунке 8.

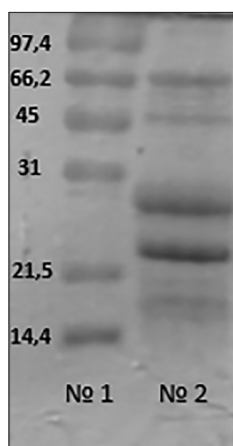


Рис. 8. Электрофореграмма белков экстракта семенников КРС, где 1 — маркеры компании «Bio-Rad» (слева указана молекулярная масса в кДа); 2 — экстракт семенников КРС

Как видно из рисунка 8, экстракт имеет сложный белковый состав, что подтверждает необходимость его очистки для получения лекарственной формы.

Результаты электрофореза стандартов гиалуронидазы и препарата «Лидаза» представлены на рисунке 9.

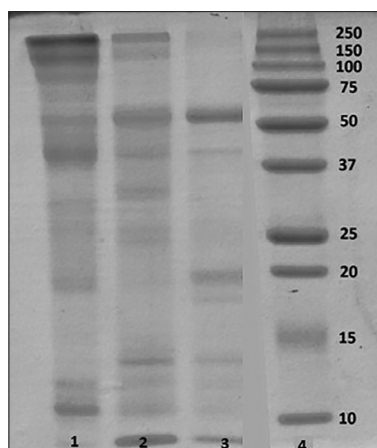


Рис. 9. Электрофореграмма белков, где 1 — стандарт гиалуронидазы BRP; 2 — стандарт гиалуронидазы Sigma; 3 — препарат «Лидаза» — лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения производства компании ООО «Самсон-Мед»; 4 — маркеры компании «Bio-Rad» (справа указана молекулярная масса в кДа)

Анализ методом электрофореза в ПААГ показал, что стандарты и препарат по белковому составу отличаются друг от друга, однако все они имеют по 2 полосы в диапазоне 37–75 кДа, что соответствует данным, полученным в результате анализа таблицы 1.

Отметим интересные выводы относительно различия в молекулярных массах фермента гиалуронидазы, которые были сделаны исследователями в ходе их экспериментальных работ:

1. Borders (1968) предположил, что разница в молекулярных массах фермента в экстракте (126 кДа) и очищенном растворе (61 кДа) обусловлена ассоциацией с белком-переносчиком (a carrier protein) или образованием димера [5]. Со вторым предположением согласился Yang (1975) в своей работе [14].

2. К похожему выводу пришел А. Ya. Khorlin (1973), который утверждал, что гиалуронидаза имеет четвертичную структуру и состоит из 4 субъединиц с молекулярной массой около 14 кДа каждая [10].

3. Harrison R.A. (1988) в ходе исследований выяснил, что в сперматозоидах буйвола и барана содержатся олигомерные формы гиалуронидазы, появляющиеся в результате межмолекулярной сшивки мономеров дисульфидными связями. Мономеры гиалуронидазы, по мнению автора, представляют собой два типа полипептидных связей с молекулярной массой 89 кДа и 81,2 кДа, в то время как олигомеры состоят из 2,4–7 форм мономеров [7].

4. Fiszler-Szafarz (1990) отметила, что пол животного не влиял на получаемые результаты, а также, что в плазме и сыворотке крови белковый состав и гиалуронидазная активность были одинаковы [6].

5. Ферментативное дегликозилирование гликопротеина гиалуронидазы ферментом peptide-N-glycosidase F, согласно данным, опубликованным D. Lase (1990), не приводило к потере активности гиалуронидазы [11].

6. Hotez P. (1992) предположил, что высоко резистентный к дальнейшим биохимическим манипуляциям белок с молекулярной массой 49 кДа получается из белка с более высокомолекулярной массой и является мономером, так как гиалуронидаза способна к полимеризации с образованием межмолекулярных дисульфидных связей. Таким образом, белок с молекулярной массой 49 кДа, выделенный из нематод, может представлять собой мономер фермента, который образует димер с молекулярной массой 87 кДа [8].

7. Игонина (1996) в своей работе сделала вывод о том, что полимерные формы гиалуронидазы и протомер (10,7 кДа), выделенный методом высокоэффективной

хроматографии, обладают одинаковой удельной активностью. Также она предположила, что образование полимерных форм гиалуронидазы возможно за счет образования дисульфидных связей между протомерами, что подтвердила экспериментом, в ходе которого произошло увеличение пика протомера в результате воздействия 2-меркаптоэтанола и восстановления SH-групп цистеина [2].

8. Meyer M.F. et al. (1997) в своих исследованиях сообщал, что после ферментативного и химического дегликозилирования выделенные им белки гиалуронидазы с молекулярной массой 60 и 75 кДа имели молекулярную массу на 15 кДа меньше, что говорит о том, что оба белка имели карбогидратные остатки (carbohydrates moieties). Также он предполагал, что сама растворимая форма белка (60 кДа) образовалась в результате протеолиза мембранно-связанного белка РН-20, который является гликопротеином с молекулярной массой около 65 кДа и связан с головкой сперматозоида с помощью гликозилфосфатидилинозитола (ГФИ-якорь). При этом он ставил под сомнение тот факт, что растворимая форма выполняет какую-либо биологическую роль, предполагая, что она просто является продуктом деградации в результате старения сперматозоида [12].

Таким образом, при выделении и очистке гиалуронидазы необходимо учитывать тот факт, что она является гликопротеином с карбогидратными остатками и обладает свойством полиморфизма, что особенно актуально при использовании мембранных методов, — требуется проверка широкой линейки мембран с определенной номинальной отсекаемой молекулярной массой.

2. Влияние температуры на гиалуронидазную активность

В работе Игониной Л.М. было сделано заключение о том, что олиго- и полимерные формы фермента гиалуронидазы, включая протомер, обладают одинаковой удельной активностью [2]; поэтому дальнейшие работы вели с модельным раствором коммерческой субстанции, содержащей гиалуронидазу.

Оценку влияния температуры на гиалуронидазную активность проводили на модельном растворе (рис. 10).

Как видно из рисунка 10, через 3 суток гиалуронидазная активность раствора, который выдерживали при комнатной температуре, снижается на 30% по сравнению с раствором в холодильнике (+2...+8 °С) или в морозильной камере (-20 °С).

Таким образом, стадии технологического процесса выделения и очистки фермента гиалуронидазы следует вести при пониженной температуре (не более 10 °С).

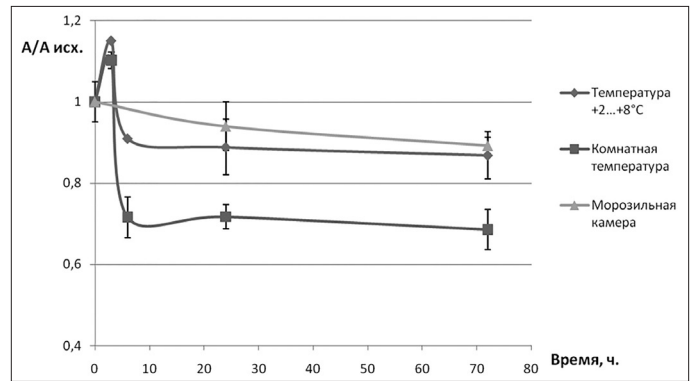


Рис. 10. Гиалуронидазная активность модельного раствора в зависимости от времени выдержки при различных температурных режимах

3. Изучение специфичности гиалуронидазы из семенников крупного рогатого скота на модельном растворе и экстракте

Изучение проводили на экстракте и модельном растворе гиалуронидазы.

Данные экспериментальных анализов определения максимальной скорости реакции представлены на рисунке 11.

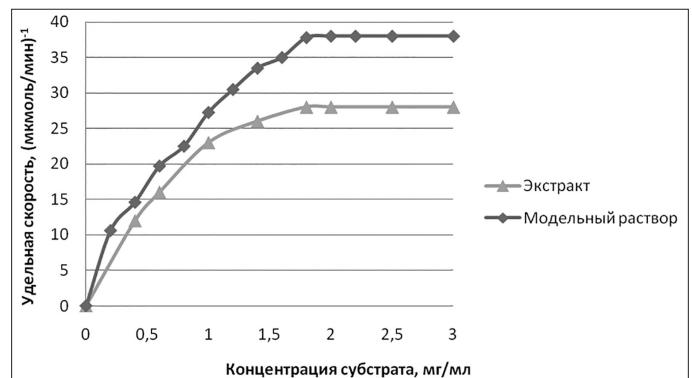


Рис. 11. Зависимость скорости реакции гидролиза гиалуронидазы от концентрации субстрата в экстракте и модельном растворе

Как видно из рисунка 11, скорость катализируемой реакции возрастает с увеличением концентрации субстрата до максимальной величины v_{\max} , после чего остается постоянной. Это следует объяснить тем, что при высоких концентрациях субстрата все активные центры молекул фермента оказываются связанными с молекулами субстрата. Любое избыточное количество субстрата может соединиться с ферментом лишь после того, как образуется продукт реакции и освободится активный центр.

Значения максимальной удельной скорости v_{\max} , полученные из графиков, представлены в таблице 2.

Таблица 2

Значения v_{max} экстракта и модельного раствора

| Параметр | Экстракт | Модельный раствор |
|--|----------|-------------------|
| v_{max} , (мкмоль/мин) ⁻¹ | 28 | 38 |

Как видно из данных, представленных в таблице 2, степень очистки влияет на скорость фермент-субстратной реакции. В исходном экстракте белковые примеси задерживают реакцию.

Для определения константы Михаэлиса — Ментен использовали метод двойных обратных величин Лайнуивера — Берка, который заключается в построении графика зависимости обратных величин скорости реакции и концентрации субстрата, представленного на рисунке 12.

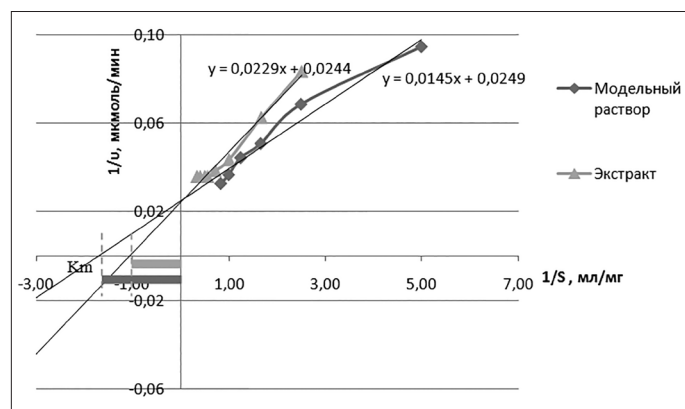


Рис. 12. График зависимости обратных величин скорости реакции и концентрации субстрата

Значения K_m сведены в таблицу 3.

Таблица 3

Значения K_m для экстракта, модельного раствора и протомера

| Параметр | Экстракт | Модельный раствор | Протомер [6] |
|---------------|----------|-------------------|--------------|
| K_m , мг/мл | 0,94 | 0,58 | 0,176 |

Чем меньше значение константы Михаэлиса — Мэнтен K_m , тем выше скорость ферментативной реакции, а значит, тем лучше и быстрее прошла реакция. Из таблицы 3 видно, что от экстракта к протомеру происходит уменьшение K_m , что свидетельствует об увеличении степени сродства фермента к субстрату, а, следовательно, и о повышении степени очистки. Однако в промышленности протомер не используют, так как его получение довольно трудоемко и экономически невыгодно [2].

Заключение

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Гиалуронидаза из семенников КРС является гликопротеином и обладает свойством полиморфизма. На основе представленных экспериментальных и литературных данных можно предположить, что растворы с гиалуронидазной активностью содержат:

- растворимую форму гликозилированного белка гиалуронидазы (55–65 кДа), образующуюся в результате протеолиза мембранно-связанного белка РН-20 (65 кДа);
- димер гликозилированного растворимого белка, образованный в результате межмолекулярной сшивки дисульфидными связями (120 кДа);
- дегликозилированную растворимую форму белка гиалуронидазы (40–45 кДа);
- димер дегликозилированного растворимого белка, образованный в результате межмолекулярной сшивки дисульфидными связями (80–90 кДа);
- мономер (11–14 кДа).

Таким образом, при использовании мембранных методов для выделения и очистки фракции, обладающей гиалуронидазной активностью, требуется проверка широкой линейки мембран с определенной номинальной отсекаемой молекулярной массой.

2. При хранении белкового раствора с гиалуронидазной активностью при комнатной температуре происходит его инактивация, что требует ведения стадий технологического процесса выделения и очистки гиалуронидазы при пониженной температуре (не более 10 °С).

4. Увеличение специфичности фермента напрямую связано с очисткой фермента, что подтверждается уменьшением константы Михаэлиса — Мэнтен. В настоящее время ведется работа по увеличению специфичности фермента путем использования сорбционно-хроматографических и мембранных методов.

Литература

1. Государственная Фармакопея XIII, том 1, М.: ФЭМБ, 2015. — 1469 с.
2. Игонина Л.М. Хроматографическое выделение и изучение свойств фермента гиалуронидазы из семенников крупного рогатого скота: дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 1996. — 134 с.
3. Мельникова Я.В., Глазова Н.В. Разработка сорбционно-хроматографического метода выделения и очистки гиалуронидазы / Сборник материалов VI Всероссийской

- научно-практической конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая Фармация – потенциал будущего». – СПб.: Изд-во СПХФА, 2016. – С. 259–262.
4. Плакунов В.К. Основы энзимологии. – М.: Логос, 2002. – 128 с.
 5. Borders C.L., Raftery M.A. Purification and partial characterization of testicular hyaluronidase // *The Journal of Biol. Chem.* – 1968. – Vol. 243(13). – P. 3756–3762.
 6. Fiszer-Szafarz B., Szafarz D., Vannier P. Polymorphism of hyaluronidase in serum from man, various mouse strains and other vertebrate species revealed by electrophoresis // *Biol. Cell.* – 1990. – Vol. 68(2). – P. 95–100.
 7. Harrison R.A.P. Preliminary characterization of the multiple forms of ram sperm hyaluronidase // *Biochem. J.* – 1988. – Vol. 252(3). – P. 875–882.
 8. Hotez P. et al. Hyaluronidase from infective *Ancylostoma hookworm* larvae and its possible function as a virulence factor in tissue invasion and in cutaneous larva migrans // *Infect. Human.* – 1992. – Vol. 60(3). – P. 1018–1023.
 9. Kaya M.O., Arslan O., Guler O.O. A new affinity method for purification of bovine testicular hyaluronidase enzyme and an investigation of the effects of some compounds on this enzyme // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 30(4). – P. 524–527.
 10. Khorlin A.Ya., Vikha I.V., Milishnikov A.N. Subunit structure of testicular hyaluronidase // *FEBS Letters.* – 1973. – Vol. 31(1). – P. 107–110.
 11. Lace D., Olavesen A.H., Gacesa P. The effects of deglycosylation on the properties of native and biotinylated bovine testicular hyaluronidase // *Carbohydrate Research.* – 1990. – Vol. 208. – P. 306–311.
 12. Meyer M.F., Kreil G., Aschauer H. The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of the membrane-bound PH-20 enzyme // *FEBS Letters.* – 1997. – Vol. 413(2). – P. 385–388.
 13. Mio K. et al. Detecting hyaluronidase and hyaluronidase inhibitors // *Proteoglycan Protocols. Methods in Molecular Biology.* – 2001. – Vol. 171. – P. 391–397.
 14. Yang C.-H., Srivastava P.N. Purification and properties of hyaluronidase from bull sperm // *The Journal of Biological Chemistry.* – 1975. – Vol. 250(1). – P. 79–83.

Список сокращений

ВЭЖХ – высокоэффективная хроматография,
 КРС – крупный рогатый скот,
 ГФ – Государственная Фармакопея,
 кДа – килодальтон,
 BRP – Biological Reference Preparation.

THE STUDY OF PHYSICO-CHEMICAL AND SPECIFIC PROPERTIES OF HYALURONIDASE FROM THE TESTES OF CATTLE

I.V. MELNIKOVA, N.V. GLAZOVA

Saint Petersburg State Academy of Chemical Pharmaceutics, Saint Petersburg

With the help of modern methods, an analysis of the physicochemical properties and specificity of hyaluronidase from cattle testes with various degrees of purification was carried out. It is shown that the extract of the testes of cattle, standards and hyaluronidase preparations have a complex protein composition; the enzyme hyaluronidase has the property of polymorphism, temperature-sensitive. An increase in the specificity of the enzyme in the drug compared to its specificity in the extract was shown.

Keywords: hyaluronidase, standard, high performance liquid chromatography, model solution, substrate specificity.

УДК 579.843.1:578.1:614.7: (470.61)

ВЫДЕЛЕНИЕ ФАГОВ И ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ И СТОКОВ В ХОДЕ ПРОВЕДЕНИЯ МОНИТОРИНГА НА ТЕРРИТОРИИ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ С 2008 Г. ПО 2017 Г.

В.Д. КРУГЛИКОВ*, Н.Е. ГАЕВСКАЯ, Д.А. ЛЕВЧЕНКО, С.В. ТИТОВА,
И.В. АРХАНГЕЛЬСКАЯ, А.В. ТЮРИНА, М.В. РЕНГАЧ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора»

Прогноз по холере в нашей стране на 2018 год остается неблагоприятным за счет рисков возможных заносов инфекции. Обнаружение в пробах воды холерных фагов VI и XII серотипов может сочетаться с циркуляцией неэпидемических штаммов *V. cholerae* O1 в водоемах, из которых был осуществлен отбор проб. Вопросы динамики обнаружения холерных фагов в пробах воды из объектов окружающей среды г. Ростова-на-Дону и возможности использования их в качестве индикаторного показателя присутствия в водном объекте холерных вибрионов O1 остаются неуточненными. На основании рассчитанного нами коэффициента корреляции установлена прямая средняя связь между выделением штаммов *V. cholerae* O1 и изоляцией холерных фагов из водоемов г. Ростова-на-Дону за изучаемый период, что дает основания предполагать, что обнаружение холерных фагов в воде может являться косвенным показателем присутствия вибрионов.

Ключевые слова: холерный вибрион, бактериофаги, водоемы, мониторинг.

Введение

На основании оценки эпидемиологической обстановки в мире и России в 2008–2017 гг. прогноз по холере в нашей стране на 2018 год остается неблагоприятным за счет рисков возможных заносов инфекции [19, 20]. При проведении ретроспективного анализа литературных данных необходимо отметить постоянное внимание исследователей к территории Ростовской области в предшествующие холерные пандемии. Кроме того, территория Дона всегда относилась к разряду местностей, чаще поражаемых холерой [3]. По данным В. Барыкина с соавт. (1925), во время VI пандемии холеры (1920–1922 гг.) на территории Ростовской области (г. Ростов-на-Дону) произошло формирование временного вторичного эндемичного очага холеры с круглогодичной регистрацией больных, где главным фактором распространения инфекции рассматривалась вода рек Дон и Темерник. В период VII пандемии в Ростовской области по-прежнему продолжали регистрироваться случаи заболевания холерой (в 1973–1975 гг.) с изоляцией десятков

штаммов возбудителя из вышеуказанных рек [14]. На современном этапе развития VII пандемии холеры при проведении мониторинговых исследований на территории РФ установлено выделение единичных токсигенных штаммов *V. cholerae* из объектов окружающей среды (ООС) на фоне ежегодной регистрации десятков нетоксигенных штаммов холерных вибрионов. Стоит отметить, что наибольшее количество штаммов было обнаружено в водоемах Южного федерального округа, а территория Ростовской области заняла 2-е место по числу выделенных штаммов холерных вибрионов O1 из ООС в РФ. Только на территории данного субъекта на фоне эпидемического благополучия регистрировалось обнаружение токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 [8]. Вместе с тем при проведении ежегодных мониторинговых исследований в г. Ростове-на-Дону было отмечено сочетание обнаружения вибриофагов в пробах воды из рек Дон и Темерник с циркуляцией нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 [6, 7, 10].

Факт циркуляции холерных фагов в воде открытых водоемов и сточных водах был ранее подтвержден многими исследователями [8, 15, 16]. Холерные фаги являются фактором, влияющим на сезонные эпидемии холеры, а также играют ключевую роль в эволюции штаммов *V. cholerae* в результате бактерицидного процесса селекции, способствующей появлению новых клонов. При этом амплификация фага в организме хозяина во время холерной эпидемии может способствовать увеличению его численности, снижению концентрации *V. cholerae* в

© 2018 г. Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Левченко Д.А., Титова С.В., Архангельская И.В., Тюрина А.В., Ренгач М.В.

* Автор для переписки:

Кругликов Владимир Дмитриевич
доктор мед. наук, заведующий лабораторией микробиологии холеры, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора»

E-mail: kruglikov_vd@antiplague.ru

окружающей среде и в результате — к затуханию эпидемии [9, 24]. Обнаружение в пробах воды холерных фагов VI и XII серотипов может сочетаться с циркуляцией неэпидемических штаммов *V. cholerae* O1 в водных ООС, из которых был осуществлен отбор проб [4, 5, 11].

Наряду с этим вопросы динамики обнаружения холерных фагов в пробах воды из ООС г. Ростова-на-Дону и возможности использования их в качестве индикаторного показателя присутствия в водном объекте холерных вибрионов O1 остаются неуточненными. Обращает на себя внимание факт отсутствия выделения штаммов *V. cholerae* O1 на фоне выделения холерных бактериофагов в период с 2011—2012 гг.; вместе с тем с 2008 по 2010 гг. нами была установлена прямая средняя корреляционная связь между обнаружением фагов XII серотипа I морфогруппы и циркуляцией нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 [10]. В 2013 году несмотря на выделение культур *V. cholerae* O1, холерные фаги выделены не были.

В связи со сказанным целью настоящего исследования явилось изучение взаимосвязи между выделением холерных фагов и штаммов холерных вибрионов O1 из проб воды стационарных точек (с.т.) г. Ростова-на-Дону в течение последних десяти лет (с 2008 г. по 2017 г.).

Материалы и методы

Выделение и идентификацию штаммов *V. cholerae*, изолированных из ООС, осуществляли в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» [13], практическим руководством «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» [12]. С 2016 года для проведения родовой и видовой идентификации выделенных штаммов холерных вибрионов нами был использован метод MALDI-TOF масс-спектрометрии [2, 22]. Фаготипирование холерных вибрионов проводили в соответствии с «Методическими указаниями по применению прямого фаготипирования возбудителя холеры Эль Тор» (1983 г.) [17]. Обнаружение и выделение холерных бактериофагов проводили общепринятыми методами в соответствии с Адамсом М. (1961) [1]. Для установления антигенной специфичности бактериофагов применяли холерные антифаговые сыворотки (I—XII серотипов). Расчет и достоверность коэффициента корреляции оценивали с помощью известной методики [21].

Результаты и обсуждение

Мониторинговые исследования водных ООС на территории г. Ростова-на-Дону одновременно были на-

правлены как на выявление холерных вибрионов, так и на обнаружение холерных фагов. В ходе исследования 1681 пробы воды из пресных поверхностных водоемов и сточных вод из с.т., закрепленных за ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», было выделено 100 холерных фагов (табл. 1). Полученные данные свидетельствовали о том, что фаги обнаруживались в пробах из всех обследуемых с.т., которые с 2016 года были частично пересмотрены.

При анализе выделения штаммов *V. cholerae* O1 и фагов из проб воды с.т. за десятилетний период была установлена ежегодная регистрация в течение 2008—2010 гг. в с.т. — река Дон, правый берег (Державинский спуск), в остальные годы указанного соответствия выявить не удалось. Что касается проб из остальных с.т., то такое соответствие было обнаружено в период от одного года до двух лет.

Так, например, в пробе воды с.т. — река Темерник (Ботанический сад, у моста) на фоне изоляции штаммов *V. cholerae* O1 констатировано выделение фагов — в 2009, 2010 и 2014 гг.; с.т. — река Дон (у железнодорожно-автомобильного моста «Западный обход») — в 2009 и 2016 гг.; с.т. — протока реки М. Донец (левый берег, 500 м ниже автомобильного моста на Кумжинскую рощу) — в 2010 г.; с.т. — река Дон (правый берег, 200 м ниже впадения реки Темерник (у железнодорожного моста) и река Дон (правый берег, Кировский спуск, напротив здания экипажа № 2 РМК им. Г.Я. Седова) — в 2008 г. В период 2011—2012 гг. на фоне выделения холерных бактериофагов штаммы холерных вибрионов O1 выделить не удалось. В 2013 году на фоне выделения *V. cholerae* O1 холерные бактериофаги не были изолированы. Однако, начиная с 2014 г. вновь регистрировалось ежегодное выделение фагов и штаммов холерных вибрионов O1 из реки Дон.

Установлено, что пик выделения холерных бактериофагов приходился на 2016 год, что связано с введением ежедневного мониторинга по с.т. г. Ростова-на-Дону в связи с осложнением эпидситуации по острым кишечным инфекциям на территории сопредельного государства (Украины) [23].

В результате проведенной идентификации с использованием фагочувствительных тест-штаммов и серологического типирования все изолированные фаги были отнесены к I морфогруппе, XII серотипу.

Количественное взаимоотношение между холерными фагами и штаммами холерных вибрионов O1, обнаруженными за десятилетний период на территории Ростовской области, иллюстрирует рисунок 1.

Распределение проб (по №№) из стационарных точек отбора, закрепленных за ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», из которых были выделены холерные фаги и штаммы холерных вибрионов О1 серогруппы

| №№ п/п | Наименование стационарной точки | Регистрационные №№ проб., из которых были выделены холерные фаги | | | | | | | | | | Регистрационные №№ проб, из которых были выделены холерные вибрионы О1 | | | | | | | | | |
|--------|--|--|---------|------------------|-------------------|---------------|------|---------|----------|------------------------------|------|--|--------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 |
| 1 | Р. Дон. Правый берег (Державинский спуск) | 36 | 136 | 35, 188 | 481 | 153, 182 | — | — | — | 103, 305, 331, 345, 357, 397 | — | 67 | 40 | 35, 46, 140 | — | 204 | — | 90 | — | — | |
| 2 | Р. Темерник. Устье впадения в реку Дон | 44 | — | 110 | 26, 153, 482 | 44, 129, 154 | — | 125 | — | 303, 304, 332, 346, 358, 398 | — | — | 73, 97 | 189 | — | — | — | — | 278 | — | |
| 3 | Городские очистные сооружения. Приемная камера КНС №4 | — | — | — | 91, 190, 448, 483 | 45, 87 | — | 34 | 92 | —* | — | — | — | — | — | — | — | — | —* | — | |
| 4 | Р. Дон. У железно-/автомост моста «Западный обход» | — | 139 | — | 191, 484 | 46 | — | — | 93 | 104, 115, 347, 359, 399, 406 | 139 | 46 | 59 | — | — | — | — | — | 39 | — | |
| 5 | Протока. р. М. Донец. Левый берег, 500 м ниже автомобильного моста (на Куминскую рощу) | — | 140 | 50, 71, 115, 125 | 351 | 47 | — | — | 129, 150 | — | — | — | — | 39, 71, 86 | — | — | — | — | — | — | |
| 6 | Р. Темерник. Ботанический сад (у моста) | — | 61, 101 | 72, 114, 193 | 352 | 90 | — | 88, 89 | 73 | 361, 387, 401 | — | 40, 72 | 77, 93 | 72, 87, 114, 124 | — | 65 | 81 | — | — | — | |
| 7 | Р. Дон. Правый берег, 200 м ниже впадения р. Темерник (у железнодорож. моста) | 41 | 110 | — | 353, 400, 487 | 112, 134, 159 | — | 70, 144 | 74 | —* | — | 57 | — | 88, 115, 170 | — | 252 | — | — | —* | — | |
| 8 | Р. Дон. Правый берег, Кировский спуск, напротив здания экипажа №2 РМК им. Г.Я. Седова | 42 | 143 | 126 | 488 | 113, 160, 189 | — | 71 | — | 350, 362, 388, 402 | 97 | 58 | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| 9 | Доп. точка. Р. Темерник. Волоколамская 2б | — | — | — | — | — | — | — | — | 97, 106, 351, 363, 389, 403 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| Итого | | 4 | 7 | 11 | 16 | 16 | — | 7 | 6 | 31 | 2 | 6 | 6 | 14 | — | 3 | 1 | 1 | 2 | — | |
| | | 100 | | | | | | | | | | 33 | | | | | | | | | |

Примечание: * — точка отбора проб воды исключена в связи с оптимизацией перечня стационарных точек; ** — дополнительная точка отбора проб воды, введена с 2016 года

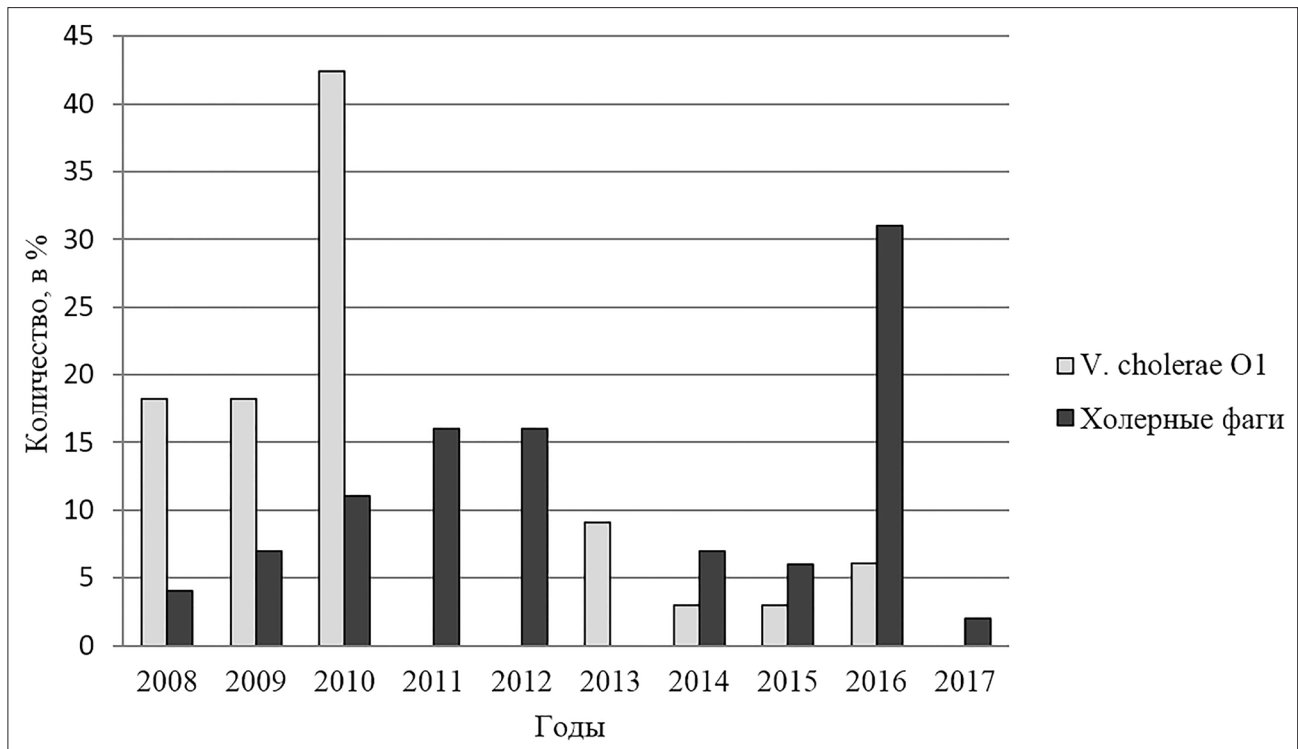


Рис. 1. Динамика выделения штаммов холерных вибрионов O1 и холерных фагов из водоемов г. Ростова-на-Дону с 2008 по 2017 гг. (в % от общего количества изолированных фагов и штаммов *V. cholerae* O1)

Исходя из указанных данных, представлял интерес анализ наличия и размера связи (по методу Спирмена [21]) между числом изолированных штаммов холерных вибрионов O1 и бактериофагов с 2008 по 2017 гг.

Однако корректный анализ можно провести только по результатам анализа проб воды с.т., закрепленных за ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», из которых проводились заборы и исследования в течение изучаемых 10 лет. К ним относились шесть с.т., кроме: с.т. городские очистные сооружения; приемная камера КНС № 4 и с.т. — река Дон, правый берег, 200 м ниже впадения реки Темерник (у железнодорожного моста), которые были исключены в результате пересмотра перечня с.т., а также дополнительной точки — река Темерник, Волоколамская, 26, которая была введена с 2016 г. В результате в работу по расчету коэффициента корреляции нами было взято 75 холерных бактериофагов (из выделенных 100) и 25 штаммов холерных вибрионов различной эпидзначимости (из изолированных 33).

На основании рассчитанного нами коэффициента корреляции (+0,57) удалось установить прямую среднюю связь с достоверностью 95% ($\rho \geq \rho_{0,95}$) между выделением штаммов *V. cholerae* O1 и изоляцией холерных фагов из водных ООС г. Ростова-на-Дону за изучаемый

период, что дает нам основания предполагать, что обнаружение холерных фагов в воде может являться косвенным показателем присутствия вибрионов. Отсутствие выделения из с.т. холерных фагов в 2013 году можно объяснить тем, что не было условий для размножения холерного вибриона в таком количестве, чтобы появились фаги, так как фаги контролируют количественную характеристику популяции микробов.

Было отмечено, что выделение фагов из определенной с.т. может предшествовать обнаружению штаммов (при последующем заборе), может быть параллельным с изоляцией штамма из одной и той же пробы или следовать за выделением штамма при повторных заборах проб воды. Примером последнего является выделение токсигенного штамма *V. cholerae* O1 El Tor Inaba № 81 из с.т. река Темерник, Ботанический сад (у моста) (дата выделения — 10.07.2014), что сопровождалось последующим выделением холерных фагов из этой же точки (12.07.2014 г. и 13.07.2014 г.).

Заключение

Таким образом, выявление холерных фагов можно рассматривать как косвенный признак, свидетельствующий о большей вероятности выявления *V. cholerae* O1

именно в этих пробах воды из водоемов или стоков. Л.В. Мироновой с соавт. (2017) в качестве индикаторного метода [18] предлагается проведение ПЦР-скрининга как нативного материала, так и сред накопления при исследовании проб из ООС в ходе мониторинговых исследований на холеру. При этом положительные результаты тестирования нативных проб оцениваются как сигнальный признак большей доли вероятности обнаружения в них штаммов холерных вибрионов O1. Однако не всегда эти данные соответствуют результатам бактериологических исследований. Мы считаем, что применение методики выделения холерных фагов из водных объектов экономически менее затратно, чем применение дорогостоящих ПЦР тест-систем для установления (при получении положительных результатов) проб, подлежащих исследованию, в первую очередь, особенно при увеличении количества и кратности заборов при реализации мероприятий по факту выделения штаммов *V. cholerae* O1 из водных ООС.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности проведения дальнейших исследований в выбранном направлении.

Литература

1. Адамс М. Бактериофаги. Пер. с англ. — М.: Иностранная литература, 1961. — 522 с.
2. Балахонов С.В., Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Куликалова Е.С., Остяк А.С. MALDI-TOF масс-спектрометрическое определение видовой принадлежности патогенов в совершенствовании эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями // Бактериология. — 2016. — Т. 1. — № 1. — С. 88–95.
3. Барыкин В., Сазенев А. Эндемический очаг холеры в Ростове-на-Дону // Труды IX Всероссийск. съезда бактериол., эпидемиол. и сан. врачей. — Л., 1926. — Т. 1. — С. 244–248.
4. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Галичева А.Л. Характеристика бактериофагов, пригодных для идентификации холерных вибрионов // Современные технологии в эпид. надзоре за акт. инфекциями. Матер. Всерос. научно-практ. конф., посвящ. 95-летию со дня рожд. акад. РАМН И.Н. Блохиной (25 мая 2015 г., Нижний Новгород). — Н. Новгород, 2016. — С. 145–147.
5. Гаевская Н.Е., Македонова Л.Д. Использование бактериофагов в лабораторной диагностике холеры // Клин. лаб. диагностика. — 2016. — Т. 61. — № 12. — С. 849–852.
6. Зубкова Д.А., Григоренко Л.В., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В., Гаевская Н.Е. О корреляции выделения холерных фагов с выделением штаммов холерных вибрионов из поверхностных водоемов и стоков в ходе мониторинга в г. Ростове-на-Дону // Региональные проблемы окружающ. среды, здоровья населения и сан.-эпид. благополучия. — Ростов-на-Дону, 2013. — № 3. — С. 132–133.
7. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Мазрухо А.Б., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Григоренко Л.В., Ежова М.И., Шестипалтынова И.С., Архангельская И.В., Подойницына О.А., Кудрякова Т.А., Гаевская Н.Е., Македонова Л.Д., Качкина Г.В. Анализ свойств холерных вибрионов, выделенных при мониторинге водоемов и стоков г. Ростова-на-Дону с 2008 по 2012 гг. // Холера и патоген. для чел-ка вибрионы. Матер. совещ. спец-ов Роспотребнадзора. — Ростов-на-Дону, 2013. — № 26. — С. 78–81.
8. Кудрякова Т.А., Евтеева Е.И., Македонова Л.Д. Изучение биологических свойств холерных фагов и штаммов вибрионов Эль-тор, выделенных из внешней среды Донца // Гигиена и санитария. — 1993. — № 12. — С. 14–17.
9. Кудрякова Т.А., Качкина Г.В., Македонова Л.Д. Характеристика бактериофагов холерных вибрионов, выделенных в 1998–2000 годах из внешней среды // Природно-очаговые ООИ на юге России, их профилактика и лабораторная диагностика. — Астрахань, 2001. — С. 183–185.
10. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Гаевская Н.Е., Качкина Г.В., Кругликов В.Д., Зубкова Д.А., Ускова Н.Н., Парагова М.С. Характеристика холерных фагов, выделенных из поверхностных водоемов и стоков г. Ростова-на-Дону в ходе мониторинга с 2008 по 2012 гг. // Холера и патогенные для человека вибрионы. — Ростов-на-Дону, 2013. — Вып. 26. — С. 168–172.
11. Кудрякова Т.А. Лизогения холерных и параземолитических вибрионов и ее практическое значение. Автореф. дис. ... доктора мед. наук. — Ростов-на-Дону, 1996. — 42 с.
12. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под редакцией академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. — М.: ЗАО «Шико», 2013. — 560 с.
13. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания 4.2.2218-07. — Москва, 2007. — 87с.
14. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ежова М.И., Москвитина Э.А., Титова С.В. Анализ результатов мониторинга холерных вибрионов в объектах окружающей среды на административных территориях России с помощью ГИС «Холера 1989–2014» // Пробл. особо опасных инф. — 2017. — № 4. — С. 99–102.
15. Либензон А.Е., Попов Ю.М., Кулов Г.И. К характеристике бактериофагов, выделенных из воды открытых водоемов // Пробл. особо опасных инф. — 1970. — № 2. — С. 37.

16. Ломов Ю.М., Сомова А.Г., Кудрякова Т.А. Холерные фаги // Ростов-на-Дону, 1990. — 159 с.
17. Методические указания по применению прямого фаготипирования возбудителя холеры Эль Тор. Сост.: Дрожжевкина М.С., Арутюнов Ю.И. — М., 1983. — 10 с.
18. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Хунхеева Ж.Ю., Пономарева А.С., Басов Е.А., Гладких А.С., Бочалгин Н.О. Современные аспекты микробиологического мониторинга холеры: интеграция молекулярно-генетических методов в диагностический процесс и схему идентификации возбудителя // Бактериология. — 2017. — Т. 2. — № 3. — С. 80.
19. Москвитина Э.А., Ломов Ю.М., Усенко Э.Г., Антонян Б.Х., Данилкин А.П. Некоторые эпидемиологические аспекты холеры на Дону в период семи пандемий // Холера: материалы Российской научной конференции. — Ростов-на-Дону, 1992. — С. 27–29.
20. Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Кругликов В.Д., Титова С.В., Водопьянов А.С., Куриленко М.Л., Пакскина Н.Д., Иванова С.М., Анисимова Г.Б., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2008–2017 гг. Прогноз на 2018 г. // Пробл. особо опасных инф. — 2018. — № 1. — С. 36–43.
21. Салатич А.И. Статистические методы в здравоохранении и медицине. — Ростов-на-Дону, 1978. — 109 с.
22. Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Водяницкая С.Ю., Чемисова О.С., Чайка И.А. Применение Масс-спектрометрического метода MALDI-TOF для межвидовой дифференциации близкородственных вибрионов // Клин. лаб. диагностика. — 2014. — Т. 59. — № 8. — С. 27–38.
23. Титова С.В., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Архангельская И.В., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Чемисова О.С., Ежова М.И., Левченко Д.А., Пичурина Н.Л., Гаевская Н.Е., Черепихина И.Я., Тюленева Е.Г., Самородова А.В., Непомнящая Н.Б. Анализ результативности работы ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора» как референс-центра по мониторингу холеры в Российской Федерации // Холера и патоген. для человека вибрионы: Сб. статей пробл. комиссии. — Ростов-на-Дону, 2017. — Вып. 30. — С. 11–18.
24. Faruque S.M., Islam M.J., Ahmad Q.S., Faruque A.S., Sack D.A., Nair G.B., Mekalanos J.J. Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics: Role of host-mediated amplification of phage // Molecular Genetics. — 2005. — Vol. 102(17). — P. 6119–6124.

ISOLATION OF PHAGES AND STRAINS OF *VIBRIO CHOLERAЕ* FROM SURFACE WATER BODIES AND DRAINS DURING THE MONITORING ON THE TERRITORY OF ROSTOV-ON-DON FROM 2008 TO 2017

V.D. KRUGLIKOV, N.Ye. GAYEVSKAYA, D.A. LEVCHENKO, S.V. TITOVA,
I.V. ARKHANGEL'SKAYA, A.V. TYURINA, M.V. RENGACH

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

The prognosis for cholera in our country for 2018 remains unfavorable due to the risks of possible infection drifts. Detection of cholera phage VI and XII serotypes in water samples can be combined with the circulation of non-epidemic *V. cholerae* O1 strains in the water bodies from which sampling was carried out. The issues of the dynamics of the detection of cholera phages in water samples from environmental objects of the city of Rostov-on-Don and the possibility of using them as an indicator of the presence of O1 cholera vibrios in a water body remain unspecified. Based on the correlation coefficient calculated by us, a direct average relationship was established between the isolation of *V. cholerae* O1 strains and the isolation of cholera phages from the reservoirs of Rostov-on-Don over the study period, which suggests that the detection of cholera phages in the water may be an indirect indicator of the presence vibrios.

Keywords: cholera vibrio, bacteriophages, reservoirs, monitoring.

СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА АКТИНОМИЦЕТОВ И АКТИВНОСТЬ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ПОЧВАХ МОНГОЛИИ

Ж. НОРОВСУРЭН*

Институт общей и экспериментальной биологии Академии наук Монголии, Улан-Батор

Актиномицетные комплексы пустынно-степных почв Монголии характеризуются рядом специфических особенностей, отличающих их от комплексов мицелиальных прокариот в других географических широтах. Впервые в образцах основных типов почв Монголии была определена активность азотфиксации. Предполагается, что продолжение исследований этого важнейшего для биосферы процесса представляет большой теоретический и практический интерес.

Ключевые слова: актиномицеты, микробиологические процессы, почвы, географические особенности.

Введение

Биология почв не только описывает явления, но и расшифровывает механизмы протекающих в почве процессов, их биохимическую сущность. Значение биологии почв в современном почвоведении постоянно увеличивается и вскрывается ее роль в процессах, протекающих в почвах, в биосферных функциях почв [2]. Почва является компонентом биогеоценоза, следовательно, почвенные актиномицеты можно рассматривать как неотъемлемый компонент биогеоценоза, где они входят в состав гетеротрофного блока организмов [3]. Актиномицеты участвуют в накоплении в почве биологически активных веществ.

Целью нашей работы явилось исследование структуры актиномицетных комплексов почв и определение активности азотфиксации в почвах Монголии.

Объекты и методы

Почвенные образцы отобраны из почв, сформированных в типичных условиях основных природно-климатических зон Монголии. Хялганатский лесной стационар, расположенный на территории Хангал сомона Булганского аймака, относится к горной лесостепной зоне [6]. Стационар Тумэнцогт сомона Сухэ-Баторского аймака представляет собой настоящую (типичную) степную зону Восточной Монголии, а Булганский стационар Южно-

Гобийского аймака находится в пределах пустынно-степной зоны Гобийского Алтая [10] (табл 1).

Общее число актиномицетов учитывали на казеин-глицериновом агаре, а идентификацию рода *Streptomyces* проводили согласно определителю Гаузе с соавторами [1].

Для наиболее полного выделения редко встречающихся форм актиномицетов из почвы был использован комбинированный метод (селективные среды с пропионатом натрия и гумус-витаминный агар) [4, 12].

В среду добавляли антибиотики: нистатин (50 мкг/мл среды) — для подавления роста грибов; налидиксовую кислоту (1,5 мкг/мл) и рубомицин (1 мкг/мл) — для подавления роста немитцелиальных бактерий.

Почвенные образцы перед посевом прогревали при 120 °С в течение 1 часа. Для предварительной идентификации культур актиномицетов учитывали фенотипические и хемотаксономические признаки (присутствие LL или мезо-изомера диаминопимелиновой кислоты и дифференцирующих сахаров в гидролизатах целых клеток) [11, 13].

Использовали показатели частоты встречаемости (отношение числа образцов, в которых встречается род, к общему числу проанализированных образцов) и частоты доминирования (отношение числа образцов, в которых род составляет более 50% всех представителей родов актиномицетов, выделяемых на используемых средах, к общему числу проанализированных образцов).

В почвенных образцах также изучали показатели, характеризующие интенсивность процессов микробной трансформации азота как одного из основных биофильных элементов. Определение активности азотфиксации выполняли стандартными методами, предложенными кафедрой биологии почв МГУ [7].

© 2018 г. Норовсурэн Ж.

* **Автор для переписки:**

Норовсурэн Жадамбаа

доктор биол. наук, лаборатория микробиологии Института общей и экспериментальной биологии Академии наук Монголии

E-mail: norvo@mail.ru

Разнообразие актиномицетов в разных типах почв

| № | Экосистемы | Название почвы | Район взятия образца | № образца | Глубина взятия образца, см | Роды актиномицетов (на среде с пропионатом натрия и НА – гумус витаминный агар) |
|---|----------------------------|---|---------------------------------------|-----------|----------------------------|---|
| 1 | Горно-лесостепь | Горно-лесная темноцветная под березовым лесом | Эрдэнэт, Хялганат. урочище – Хайлант | 266 | 10–20 | <i>Streptomyces</i> и <i>Micromonospora</i> |
| 2 | Горно-лесостепь | Лесная супесчаная | Эрдэнэт, Хялганат. место Сосновый бор | 273 | 5–22 | <i>Streptomyces</i> и <i>Micromonospora</i> |
| 3 | Горно-лесостепь | Дерново-луговая старопойменная | Эрдэнэт, Хялганат. урочище – Хайлант | 278 | 10–20 | <i>Streptomyces</i> , <i>Micromonospora</i> и <i>Streptosporangium</i> |
| 4 | Горно-лесостепь | Темно-каштановая легкосуглинистая | Эрдэнэт, Хялганат урочище – Хайлант | 279 | 10–20 | <i>Streptomyces</i> , <i>Micromonospora</i> и <i>Streptosporangium</i> |
| 5 | Настоящая (типичная) степь | Темно-каштановая | Сухэ-Батор аймак, Тумэнцогт сомон | 8 и (290) | 5–20 и (10–20) | <i>Streptomyces</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Streptosporangium</i> и <i>Actinomadura</i> |
| 6 | Пустынная степь | Бурая пустынно-степная суглинистая | Южный – Гоби, Булган сомон | 117 | 10–35 | <i>Streptomyces</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Thermomonospora</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Dactylosporangium</i> и <i>Nocardia</i> |

Результаты и обсуждение

При развитии в почве мицелиальные организмы обладают определенными преимуществами: они способны проникать через поверхности раздела фаз и колонизировать новые пространства и осуществляют транспорт питательных веществ на расстояние. Резкие колебания влажности, температуры, радиации, временные перерывы в снабжении организмов водой и питательными веществами, характерные для почв, послужили главными факторами эволюции актиномицетов. В результате у них сформировались специализированные переживающие стадии в цикле развития – споры и спорангии – для репродукции и распространения в условиях засухи [5].

Общая численность актиномицетов в разных почвах Монголии колеблется от $4,6 \times 10^4$ КОЕ/г почвы до $7,6 \times 10^5$ КОЕ/г почвы на казеин-глицериновом агаре (рис. 1).

Применение селективных питательных сред (с пропионатом натрия и НА – гумус витаминный агар) с добавлением антибиотика и предварительной обработкой позволило установить присутствие в разных почвах Монголии разнообразие родов актиномицетов *Streptomyces*,

Micromonospora, *Saccharopolyspora*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*, *Thermomonospora*, *Microtetraspora*, *Dactylosporangium* и *Nocardia* [8, 9] (см. табл. 1).

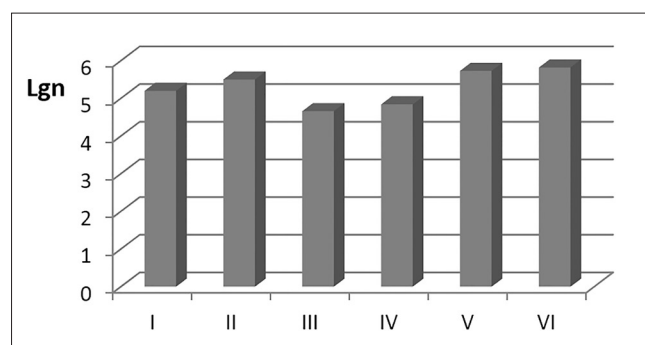


Рис. 1. Численность актиномицетов (КОЕ/г почвы). Почвы: I – горно-лесная темноцветная под березовым лесом; II – лесная супесчаная; III – дерново-луговая старопойменная; IV – темно-каштановая легкосуглинистая; V – темно-каштановая; VI – бурая пустынно-степная суглинистая

Общая численность родов *Micromonospora* и *Streptosporangium* сопоставима со стрептомицетами в горно-лесных экосистемах, где доминируют *Streptomyces* и *Micromonospora*.

Разнообразие родового спектра актиномицетного комплекса в темно-каштановых почвах Монголии объясняется обогащением ее карбонатами.

В южных почвах Монголии доля других родов актиномицетов, в том числе традиционно считающихся редкими или редко встречающимися в почве, увеличивается (см. табл. 1). Актиномицетные комплексы пустынно-степных почв Монголии характеризуются рядом специфических особенностей, отличающих их от комплексов мицелиальных прокариот в других географических широтах. Важно подчеркнуть, что выявляются эти зональные особенности при рассмотрении актиномицетов в масштабе всей экосистемы примерно на том же уровне, на котором обычно исследуется структура растительных и животных сообществ в геоботанике и геоэкологии.

Это свидетельствует о фундаментальности основных биогеографических законов, в частности, принципа зональности, и их применимости даже к столь своеобразным и нетрадиционным для классической биогеографии группам, как актиномицеты.

Фиксация молекулярного азота — одна из главных функций микроорганизмов в биосфере Земли. Благодаря ей был создан и ныне поддерживается азотный статус всех наземных и водных экосистем. Активность азотфиксации является одним из интегральных показателей биологической активности почв и поэтому широко используется для ранней диагностики загрязненности почв тяжелыми металлами, ядохимикатами, ксенобиотиками, применяется при санитарно-гигиеническом нормировании токсических веществ в почве [12].

По нашим данным, активность азотфиксации следующая: горно-лесная темноцветная — 2,375 нмоль C_2H_4 /г·час; лесная супесчаная — 1,476 нмоль C_2H_4 /г·час; дерново-луговая старопойменная — 1,861 нмоль C_2H_4 /г·час; темно-каштановая легкосуглинистая — 1,54 нмоль C_2H_4 /г·час; темно-каштановая — 1,412 нмоль C_2H_4 /г·час и бурая пустынно-степная суглинистая — 1,431 нмоль C_2H_4 /г·час. Нами отмечено достоверное увеличение азотфиксации в почвах с более высоким содержанием гумуса: лесной темноцветной и дерново-луговой старопойменной.

Заключение

На основании проделанной работы можно сделать такие выводы:

- Специфичность почвенных актиномицетных комплексов позволяет использовать их для характеристики основных типов почв Монголии.

- Впервые в образцах основных типов почв Монголии была определена активность азотфиксации. Предполагается, что продолжение исследований этого важнейшего для биосферы процесса представляет большой теоретический и практический интерес.

Благодарность. Данная работа выполнена (1998–2004 гг.) на кафедре биологии почв МГУ имени М.В. Ломоносова. С 1998 г. проводится совместная работа с сотрудниками кафедры по почвенной микробиологии. Особую благодарность автор выражает д.б.н., проф. Г.М. Зеновой, д.б.н., проф. М.М. Умарову, д.б.н., доц. Н.А. Манучаровой, к.б.н., доц. Н.В. Костиной.

Литература

1. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. — М.: Наука, 1983. — 245 с.
2. Звягинцев Д.Г., Бабьева И.П., Зенова Г.М. Биология почв. Учебник. — М.: Изд-во МГУ, 2005. — 445 с.
3. Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. — М.: ГЕОС, 2001. — 257 с.
4. Зенова Г.М. Почвенные актиномицеты редких родов. — М.: Изд-во МГУ, 2000. — 81 с.
5. Калакуцкий Л.В., Зенова Г.М. Экология актиномицетов // Успехи микробиологии. — 1984. — Т. 19. — С. 203–222.
6. Леса Монгольской Народной Республики (география и типология). — М.: Наука, 1978. — 127 с.
7. Методы почвенной микробиологии и биохимии. — М.: Изд-во МГУ, 1991. — 340 с.
8. Норовсурэн Ж. Почвенные актиномицеты редких родов в основных экосистемах Монголии: автореф. дисс...к.б.н. — М., 2001. — 21 с.
9. Норовсурэн Ж. Экология редких родов актиномицетов в почвах Монголии и их роль в почвообразовании: автореф. дисс...д.б.н. — М., 2007. — 44 с.
10. Юнатов А.А. Основные черты растительного покрова Монгольской Народной Республики // Труды Монгольской комиссии. Вып. 39. — М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1950. — 283 с.
11. Hasegawa T., Takizawa M., Takida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes // J. Gen. Appl. Microbiol. — 1983. — Vol. 29. — P. 319–322.
12. Hayakawa M., Nonomura H. HV agar, a new selective medium for isolation of soil actinomycetes // Abstracts of papers presented at the Annual Meeting of the Actinomycetologists. — Osaka, Japan, 1984. — P. 6.
13. Schaal K.P. Identification of clinically significant actinomycetes and related bacteria using chemical techniques / In: Chemical Methods in Bacterial Systematics, pp. 359–381. Edited by M. Goodfellow & D. E. Minnikin. — London: Academic Press, 1985..

THE STRUCTURE OF THE COMPLEX OF ACTINOMYCETES AND THE ACTIVITY OF MICROBIOLOGICAL PROCESSES IN THE SOILS OF MONGOLIA

J. NOROVSUREN

Institute of General and Experimental Biology of the Academy of Sciences of Mongolia, Ulan Bator

The actinomycete complexes of desert-steppe soils of Mongolia are characterized by a number of specific features that distinguish them from complexes of mycelial prokaryotes in other geographic latitudes. For the first time in samples of the main soil types in Mongolia, the activity of nitrogen fixation was determined. It is assumed that the continuation of studies of this process, which is the most important for the biosphere, is of great theoretical and practical interest.

Keywords: actinomycetes, microbiological processes, soils, geographical features.

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕЛЕВЫХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТА ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

М.В. ВИШНЕВСКАЯ^{1*}, Д.А. ГАЗИЗОВА^{1,2}, Г.У. БАДРАНОВА¹,
П.М. ГОТОВЦЕВ¹, Р.Г. ВАСИЛОВ¹

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»*,

² *Московский физико-технический институт (Государственный университет), Москва*

На сегодняшний день проводится все больше исследований по изучению таких полимерных материалов, как гидрогели. Некоторые их свойства позволяют с успехом использовать их в качестве электродов в биотопливных элементах. В будущем устройства с подобным строением смогут широко применяться в качестве биосовместимых генераторов электроэнергии для имплантируемых устройств. В данной статье исследуется применение геля на основе поли(3,4-этилендиокситиофена), легированного полистиролсульфонатом (PEDOT:PSS) в электрохимической ячейке, использующей фермент глюкозооксидазу в качестве катализатора.

Ключевые слова: ферментные биотопливные элементы, глюкозооксидаза, гидрогель, PEDOT:PSS.

Введение

Разработка имплантируемых устройств — одна из важных задач современной медицины [12]. Большинство разработанных аппаратов нуждается в постоянных источниках энергии и использует батареи, которые обладают рядом недостатков: большие размеры и ограниченная емкость [15]. Такие батареи требуют периодической замены, а значит, хирургического вмешательства, которое, например, для пациентов с кардиостимуляторами может проходить болезненно. В связи с этим создание биотопливных элементов (БТЭ) с последующей возможностью их имплантации является сегодня актуальной задачей для биоэнергетики [8].

Хорошим субстратом для таких устройств может служить глюкоза — один из главных источников энергии в живом организме [5]. Простым примером БТЭ, использующих глюкозу в качестве топлива, являются БТЭ на основе глюкозо-перерабатывающих ферментов [8]. Принцип работы данных ячеек основан на использовании ферментов в качестве катализаторов окисления глюкозы и преобразовании энергии в электричество [18]. Схема

такого устройства, использующего в качестве катализатора окисления глюкозы ферменты глюкозооксидазу и лакказы в качестве катализатора катодной реакции восстановления кислорода, представлена на рисунке 1 [10].

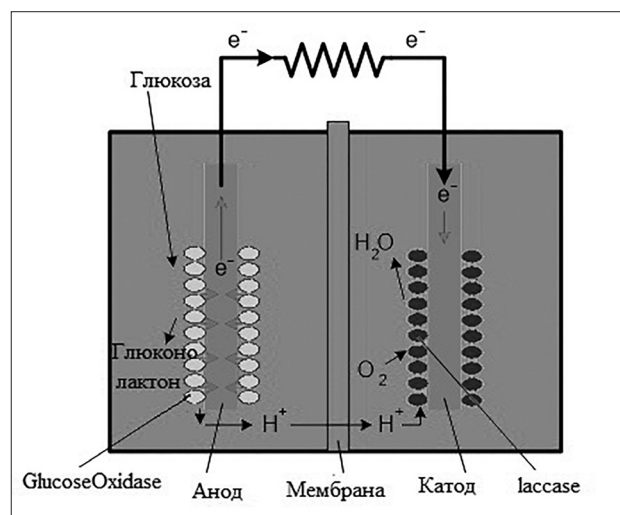


Рис. 1. Схема ферментного БТЭ, использующего в качестве субстрата глюкозу

Наиболее распространенным ферментом, перерабатывающим глюкозу, является глюкозооксидаза, которую для окисления глюкозы наносят на анод [20]. Причина популярности данного фермента заключается в его высокой стабильности в широком диапазоне температур и при различных рН (наиболее стабилен при рН 5) [20].

Возможность использования ферментного биотопливного элемента (ФБТЭ) как источника питания для имплантируемого устройства уже была показана на крысах. В работе [21] в качестве биоэлектродов использовались углеродные нанотрубки, а катализаторами реакций служили ферменты глюкозооксидаза и лакказы, которые предварительно были помещены в кремниевую трубку, обернутую в диализный мешок и затем загерметизированную в биосовместимой пробирке. Общий объем данной системы составил 2,4 мл, среднее выходное напряжение достигало 0,57 В, а мощность 193,5 мкВт/см². Таким образом, данный БТЭ мог питать светодиод или цифровой термометр. В работе [7] в брюшную полость крысы был помещен ФБТЭ, в котором роль анода выполнял графитовый диск с нанесенными на него убиноном, глюкозооксидазой и каталазой, а катодом служил графитовый диск с хингидроном и полифенолоксидазой. Оба электрода были упакованы в диализный мешок, что позволяло глюкозе и кислороду поступать в устройство. Общий объем такого БТЭ составил 0,113 мл, а мощность в 7,52 мкВт/мл наблюдалась в течение нескольких часов.

Такие ферменты, как глюкозооксидаза и лакказы, использующиеся в БТЭ, могут быть помещены непосредственно в объеме раствора, а могут быть иммобилизованы на поверхности электрода. При расположении фермента в растворе его время жизни очень мало, поэтому для увеличения стабильности его лучше наносить на электрод. В качестве электродов для БТЭ могут быть применены различные проводящие материалы: в работе [19] в качестве электродов для глюкозного БТЭ использовались углеродные нанотрубки с изолированными платиновыми площадками.

Использование гелей на основе полимерных материалов — один из способов закрепления ферментов на поверхности электрода. Этот метод имеет ряд преимуществ: гели способны не только увеличивать стабильность [11] и время жизни ферментов, но и позволяют нанести большее количество фермента из-за своей пористой структуры и обеспечить лучшую электронную проводимость к металлу электрода [3, 16]. Примером использования таких гелей на электродах является БТЭ из [16]: в этой работе на аноде использовался гель из водного раствора 55% Os[(1,1-диметил-2,2'-биимидазола) 2-2-[6-метил-пирид-2-ил] имидазола]^{2+/3+} с нанесенным на него 35% раствором фермента глюкозооксидазы и 10% раствором полиэтиленгликоля, а в качестве катода выступал гидрогель из 62,6% [Os(4,4'-дихлор-2,2'-бипиридина)₂Cl^{1+/2+}, 30% раствора фермента билирубиноксидазы и 7,4% полиэтиленгликоль диглицидилового

эфира (PEGDGE). Максимальный ток, создаваемый таким БТЭ, составил 116 нА, а максимум мощности в 39 нВт наблюдался при потенциале 0,357 В. Также гидрогели могут быть использованы в качестве микрофарфетов для нанокомпозитов из углеродных нанотрубок и нафтона [6]. В работе [16] глюкозооксидаза и лакказы с помощью ковалентного связывания наносились на такой нанокомпозит, который предварительно был иммобилизован на гидрогель из полиэтиленгликольдиакрилата. В БТЭ с помощью гидрогелей на поверхности электрода могут быть закреплены не только ферменты, но и различные микроорганизмы. В исследовании Kumar G.G. et al. [14] в качестве анода для микробного БТЭ были использованы углеродные нанокомпозитные гидрогели, полученные с помощью метода суспензионной полимеризации на основе нанотрубок и оксида графена, что обеспечило высокую площадь поверхности электрода, большое количество активных центров и облегчило процесс переноса электронов.

Для использования таких материалов в медицине важно, чтобы входящие в его состав компоненты были биосовместимыми, нетоксичными и биоразлагаемыми. Компонентами, которые обладают данными свойствами, являются такие материалы, как поливиниловый спирт (PVA) [13] и PEDOT:PSS [9]. Более того, PEDOT:PSS обладает высокой электропроводимостью и поэтому служит хорошим материалом для использования в составе электрода [17].

Таким образом, целью настоящей работы является изучение электродов на основе электропроводящих гидрогелей. В частности, изучается возможность использования гидрогелей с добавлением PEDOT:PSS в ФБТЭ на основе глюкозооксидазы.

Материалы и методы

В работе использовался гидрогель на основе таких полимерных материалов, как PVA (поставщик Авилон-КомпаниХим, Россия), йота-каррагинан (i-CRG) (поставщик Special Ingredients, Великобритания), PEDOT:PSS, полученный на основе методики, представленной в работе [2], фермент глюкозооксидаза, физрастворы с глюкозой (5 и 0,05%) и раствор NaCl (0,9%). Измерения вольт-амперной характеристики (ВАХ) ячейки ФБТЭ проводились на потенциостате IPC-Micro.

Приготовление гидрогеля. Синтез гидрогеля был проведен на основе методов, представленных в работах [2, 4]. Для приготовления гидрогеля необходимо было смешать два раствора полимеров. Раствор i-CRG был

приготовлен путем разбавления его порошка в подогретой воде и растворения его в течение 40 мин при $+70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Размешивание проводилось на магнитной мешалке в конической колбе, укрытой фольгой во избежание потерь объемов за счет испарения. Раствор PVA готовился таким же образом, за исключением времени размешивания, которое составляло 3 ч. Концентрация каждого полимера составляла 2,5% об. После приготовления обоих растворов полимеров их объединяли и мешали при том же нагреве еще 3 ч. Электропроводящий полимер PEDOT:PSS добавлялся в систему в начале смешивания в соотношении 4:1:1.

Далее готовую смесь переливали в чашку Петри и ставили в морозильную камеру. После 18 ч замораживания при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ гель размораживали при комнатной температуре ($+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) на протяжении 6 ч. Такой цикл замораживания/оттаивания был повторен 3 раза. После последнего размораживания гидрогель был высушен при повышенной температуре (до $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) до полностью сухого состояния.

Сбор ячейки ФБТЭ. В качестве анода использовали гидрогель ($m_0=0,0075\text{ г}$, $S\approx 8\text{ см}^2$) с нанесенным на него ферментом глюкозооксидазой. Водный раствор фермента общей концентрацией 6,4% был нанесен на закрепленный на Ni подложке гидрогель в количестве 0,95 мл. Сама Ni подложка представляла собой две Ni пластины (размер каждой $5\times 47,5\text{ мм}$), скрепленные между собой Ni проволокой, с выведенными посередине штырями для лучшего закрепления геля. Катодом выступали Ni пластины с той же площадью поверхности.

Ячейку собирали в стеклянной чашке Петри, добавив физраствор с глюкозой, и с помощью потенциостата снимали ее ВАХ.

Снятие ВАХ. ВАХ измерялись при добавлении в ячейку физрастворов с глюкозой различных концентраций. Также было проведено измерение с 0,9%-ным раствором NaCl. Электроды при измерении были подвешены. Показания снимали от -300 мВ до 300 мВ и обратно до -300 мВ (без перерыва) с шагом 20 мВ , временной шаг — до установления тока. После каждой серии экспериментов электроды промывались дистиллированной водой.

Результаты и обсуждение

Для проверки возможности использования геля с нанесенным на него ферментом в качестве электрода для ФБТЭ были сняты ВАХ собранной ячейки при добавлении различных электролитов. Измерение ВАХ проводилось на потенциостате ИРС-Micro.

В ходе эксперимента была снята ВАХ при добавлении в ячейку 10 мл физраствора с 5% содержанием глюкозы. В данном случае максимальное значение зарегистрированного тока составило $4,8\text{ мкА}$ (300 мВ), а минимальное значение зарегистрированного тока равнялось $-38,4\text{ мкА}$ (-300 мВ). Мощность БТЭ при работе «на потребителя» составила 9 мкВт . Высокие значения тока при отрицательных потенциалах могут объясняться процессами, связанными с диффузией кислорода к катоду.

Затем снимали ВАХ ячейки с 10 мл физраствора с 0,05% содержанием глюкозы. Максимальное и минимальное значения зарегистрированного тока составили $5,8\text{ мкА}$ (300 мВ) и $0,2\text{ мкА}$ (-300 мВ) соответственно. Мощность БТЭ при работе «на потребителя» в случае раствора с 0,05% содержанием глюкозы составила также порядка 9 мкВт .

Близкие мощностные параметры при разнице концентрации субстрата на порядок говорят о том, что в данном БТЭ явно недостаточна концентрация фермента на электроде, то есть концентрация субстрата намного больше константы Михаэлиса — Ментен, соответственно, концентрация продукта определяется по соотношению [1]:

$$[P]=Lk[E]/k_m,$$

где: $[P]$ — концентрация продукта, L — толщина диффузного слоя у поверхности анода, k — константа скорости реакции, $[E]$ — концентрация иммобилизованного фермента на поверхности, k_m — коэффициент массопереноса продукта.

Из соотношения видно, что концентрация продукта реакции на аноде и вырабатываемая БТЭ мощность [1] в данном случае зависят, в первую очередь, от концентрации фермента. Ввиду этого дальнейшее развитие электродов на основе электропроводящих гидрогелей будет направлено на повышение концентрации фермента и, следовательно, повышение мощности БТЭ. При данных концентрациях глюкозы в среде наблюдается ее значительный избыток, по сравнению с возможностями ее переработки.

При добавлении в ячейку физраствора NaCl 0,9% без глюкозы были получены малые, по сравнению с экспериментами с физрастворами с содержанием глюкозы, токи, а ВАХ носит практически линейный характер, что говорит об отсутствии генерации электрического тока. Максимальное значение — $3,8\text{ мкА}$ (260 мВ), минимальное значение — $0,2\text{ мкА}$ (-300 мВ).

На рисунке 2 приведена диаграмма сравнения ВАХ всех трех экспериментов.

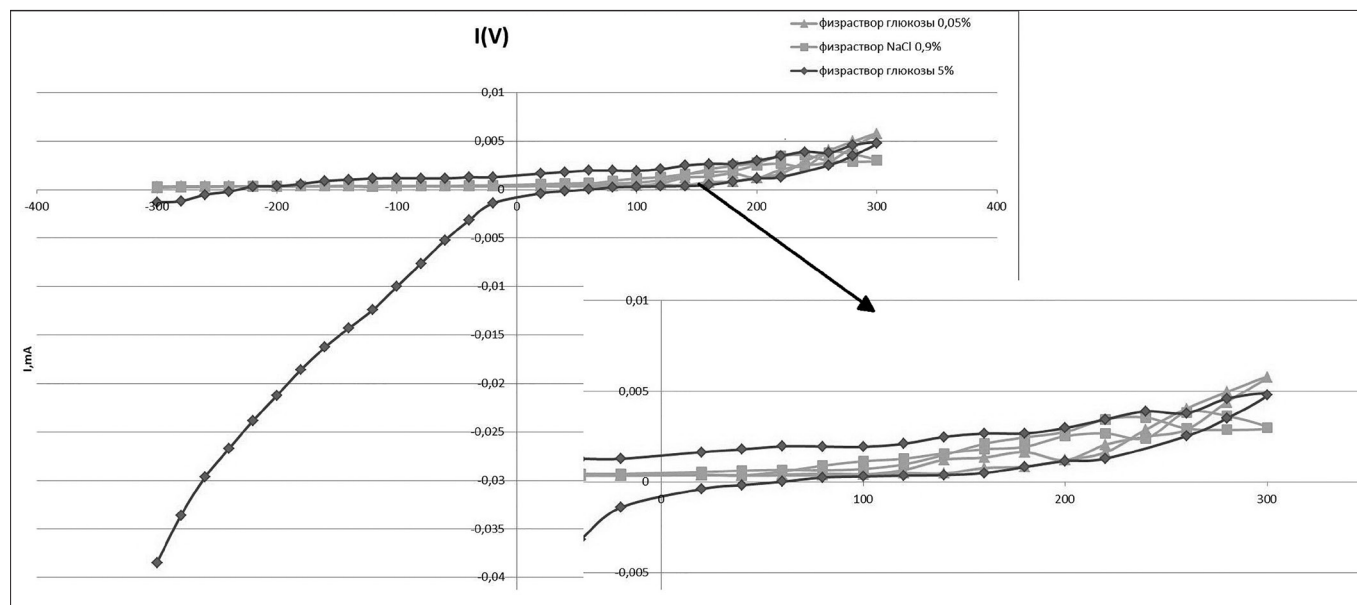


Рис. 2. Сравнение ВАХ

Заключение

Использование гидрогелей в ФБТЭ — относительно новая область исследования. Из полученных результатов можно сделать вывод о пригодности использования гидрогелей с добавлением PEDOT:PSS в ФБТЭ. Также показано, что потенциал таких электродов в части возможного количества ферментов, которые могут быть там иммобилизованы, на сегодня пока что не определен. Дальнейшие исследования будут направлены на анализ предела данного материала по иммобилизации ферментов и оценки максимально возможных развиваемых данным типом БТЭ мощностей.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Баника Ф.-Г. Химические и биологические сенсоры: основы и применения. — М.: Техносфера, 2014. — 880 с. — С. 109–110.
2. Большин Д.С., Готовцев П.М. Разработка новых источников электрического тока для имплантируемых устройств // Ученые записки физического факультета Московского университета. — 2018. — № 4. — 1840704.
3. Aquino Neto S., Minter S.D., de Andrade A.R. Developing ethanol bioanodes using a hydrophobically modified linear polyethylenimine hydrogel for immobilizing an enzyme cascade // Journal of Electroanalytical Chemistry. — 2018. — Vol. 812. — P. 153–158.
4. Badranova G.U. et al. Biopolymer-based hydrogels for encapsulation of photocatalytic TiO₂ nanoparticles prepared by the freezing/thawing method // Journal of Molecular Liquids. — 2016. — Vol. 223. — P. 16–20.
5. Barton S.C., Gallaway J., Atanassov P. Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices // Chem. Rev. — 2004. — Vol. 104. — P. 4867–4886.
6. Choi S.D. et al. Enzyme immobilization on microelectrode arrays of CNT/Nafion nanocomposites fabricated using hydrogel microstencils // Microelectronic Engineering. — 2015. — Vol. 141. — P. 193–197.
7. Cinquin P. et al. A glucose BioFuel cell implanted in Rats // PLoS ONE. — 2010. — Vol. 5(5). — P. 1–7.
8. Dagdeviren C., Li Z., Wang Z.L. Energy harvesting from the animal/human body for self-powered electronics // Annual Review of Biomedical Engineering. — 2017. — Vol. 9. — P. 85–108.
9. Furukawa Y. et al. Monitoring neural stem cell differentiation using PEDOT-PSS based MEA // Biochimica et Biophysica Acta. — 2013. — Vol. 1830(9). — P. 4329–4333.
10. Gotovtsev P. et al. Bioenergy Based Power Sources for Mobile Autonomous Robots // Robotics. — 2018. — Vol. 7(1). — P. 2.
11. Han Y. et al. Silk fibroin-based hydrogels as a protective matrix for stabilization of enzymes against pH denaturation // Molecular Catalysis. — 2018. — Vol. 457. — P. 24–32.
12. Joung Y.-H. Development of implantable medical devices: from an engineering perspective // International Neurology Journal. — 2013. — Vol. 17(3). — P. 98–106.
13. Kenawy E.R. et al. Physically crosslinked poly(vinyl alcohol)-hydroxyethyl starch blend hydrogel membranes: Synthesis and characterization for biomedical applications // Arabian Journal of Chemistry. — 2014. — Vol. 7(3). — P. 372–380.

14. Kumar G.G. *et al.* Graphene oxide/carbon nanotube composite hydrogels-versatile materials for microbial fuel cell applications // *Macromolecular Rapid Communications*. – 2014. – Vol. 35(21). – P. 1861–1865.
15. Mallela V.S., Ilankumaran V., Rao S.N. Trends in cardiac pacemaker batteries // *Indian Pacing and Electrophysiology Journal*. – 2004. – Vol. 4(4). – P. 201–212.
16. Mark A.G. *et al.* On-chip enzymatic microbiofuel cell-powered integrated circuits // *Lab on a Chip*. – 2017. – Vol. 17(10). – P. 1761–1768.
17. Pranti A.S. *et al.* PEDOT:PSS coating on gold microelectrodes with excellent stability and high charge injection capacity for chronic neural interfaces // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2018. – Vol. 275. – P. 382–393.
18. Rasmussen M., Abdellaoui S., Minteer S.D. Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 76. – P. 91–102.
19. Ryu J. *et al.* Intense pulsed light induced platinum-gold alloy formation on carbon nanotubes for non-enzymatic glucose detection // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2010. – Vol. 26(2). – P. 602–607.
20. Wilson R., Turner A. Glucose oxidase: An ideal enzyme // *Biosensors & Bioelectronics*. – 1992. – Vol. 7(3). – P. 165–185.
21. Zebda A. *et al.* Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices // *Scientific Reports*. – 2013. – Vol. 3. – Article number: 1516.

Список сокращений:

PEDOT:PSS – поли(3,4-этилендиокситиофен) легированный полистиролсульфонатом);

БТЭ – биотопливный элемент;

ФБТЭ – ферментный биотопливный элемент;

PEGDE – полиэтиленгликоль диглицеридоловый эфир;

PVA – поливиниловый спирт;

i-CRG – йота-карагинан;

ВАХ – вольт-амперная характеристика.

THE USE OF GEL ELECTRODES FOR THE STUDY OF BIOFUEL CELLS BASED ON THE ENZYME GLUCOSE OXIDASE

M.V. VISHNEVSKAYA^{1*}, D.A. GAZIZOVA^{1,2}, G.U. BADRANOVA¹,
P.M. GOTOVTSEV¹, R.G. VASILOV¹

¹ National Research Centre «Kurchatov Institute»,

² Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow, Russia

Today, more and more studies are being conducted to study polymeric materials such as hydrogels. Some of their properties make it possible to successfully use them as electrodes in biofuel cells. In the future, devices with a similar structure can be widely used as biocompatible electric power generators for implantable devices. This article explores the use of a poly (3,4-ethylenedioxythiophene) gel doped with polystyrene sulfonate (PEDOT:PSS) in an electrochemical cell using the enzyme glucose oxidase as a catalyst.

Keywords: enzyme biofuel elements, glucose oxidase, hydrogel, PEDOT:PSS.

РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТА ФИБРИНА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР VERO И ВНК-21 И РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

С.В. ГЕНЕРАЛОВ*, И.М. ЖУЛИДОВ, М.В. АНТОНЬЧЕВА, К.И. ХОЛМАТОВ,
Ю.К. ГАВРИЛОВА, Е.Г. АБРАМОВА, А.Д. БЕЛОУСОВ, Е.А. УСАЧЕВ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора»,
Саратов

Разработана питательная среда на основе ферментативного гидролизата фибрина для культивирования клеток млекопитающих, в частности, перевиваемых клеточных линий Vero и ВНК-21, а также накопления в них вирусов, в частности, аттенуированного вируса бешенства штамма «Москва 3253». Клетки Vero и ВНК-21 при культивировании на предлагаемой среде сохраняли пролиферативную активность и особенности морфологии, характерные для каждого вида клеток. Установлен сопоставимый уровень накопления вируса на клетках Vero и ВНК-21 с использованием экспериментальной и контрольных питательных сред.

Ключевые слова: питательная среда, гидролизат фибрина, перевиваемая культура клеток, вирус бешенства.

Введение

В биотехнологии и вирусологии для культивирования клеточных культур и последующей репродукции вирусов на клеточных культурах применяют питательные среды определенного химического состава, используемые как с добавлением сыворотки крупного рогатого скота (КРС), так и без нее. Таковыми средами являются среда Игла МЕМ, среда Игла МЕМ в модификации Дульбекко, среда 199 (среда Хенкса), среда Хэма, среда Мак-Коя, среда Лейбовица и другие коммерчески доступные питательные среды [15]. Применение таких сред при крупномасштабных условиях получения биомассы вирусов может оказаться дорогостоящим. Оптимальным способом снижения стоимости сред является использование гидролизатов белков растительного и животного происхождения [5, 7, 9], поскольку в их состав входят низкомолекулярные пептиды, микроэлементы и другие биологически активные соединения, обеспечивающие обменные процессы в клетках [13].

В ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора» ранее была разработана технология крупномасштабного культивирования вируса бешенства штамма «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero [3]. Указанная технология используется на этапе получения материала для иммунизации лошадей-продуцентов антирабической сыворотки в производстве препарата постэкспозиционной профилактики бешенства — антирабического иммуноглобулина. Фибрин, образующийся при получении сыворотки из иммунной плазмы крови лошадей, может быть использован для изготовления основы питательной среды [6, 9]. К настоящему моменту разработана технология изготовления ферментативного гидролизата фибрина крови лошадей [6], а также получены данные об использовании питательных сред, приготовленных на его основе, для выращивания различных микроорганизмов [2, 12].

Целью настоящей работы явилась разработка питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина и оценка возможности ее применения для культивирования клеток млекопитающих и вируса бешенства в них.

Материалы и методы

Клеточные линии Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки) и ВНК-21 (клетки почки сирийского

© 2018 г. Генералов С.В., Жулидов И.М., Антоньчева М.В., Холматов К.И., Гаврилова Ю.К., Абрамова Е.Г., Белоусов А.Д., Усачев Е.А.

* Автор для переписки:

Генералов Сергей Вячеславович
кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник,
Российский научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора
E-mail: svgeneraloff@gmail.com.

хомяка) получены из коллекции ООО «Биолот» (Россия). Обе культуры предварительно были исследованы на отсутствие микоплазм. Фиксированный штамм вируса бешенства «Москва 3253» (номер депозита 61/91, пассаж 3) был получен из ФГБУ НЦЭСМП (Москва, Россия), который затем был адаптирован к репродукции в клетках Vero [3].

В качестве контрольных питательных сред для культивирования клеточных культур и вируса бешенства использовали среды Игла МЕМ (ООО «Биолот», Россия) и 199 (ООО «Биолот», Россия), к которым добавляли сыворотку КРС (ООО «Биолот», Россия).

Фибрин получали на этапе дефибрикации иммунной плазмы крови лошадей-продуцентов антирабической сыворотки. Гидролизат фибрина получали по способу, описанному ранее [6]. В качестве протеолитического агента использовали ферменты поджелудочной железы КРС.

Определение физических свойств, химического состава и биологических показателей жидкой питательной основы проводили в соответствии с методиками, изложенными в Государственной Фармакопее Российской Федерации, издание XII, ч. I [4], ФС 42-3874-99 «Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов» [14], МУК 4.1/4.2588-96 «Методы контроля медицинских иммунологических препаратов, вводимых людям» [11], МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [10].

Приготовленный жидкий ферментативный гидролизат концентрировали на вакуум-выпарной установке УВВ-50 и высушивали методом «псевдокипящего слоя» на установке распылительного типа КЯУЛ 101325.002.

Экспериментальную питательную среду для культивирования клеточных культур готовили в асептических условиях. Навеску сухого ферментативного гидролизата фибрина растворяли в стерильном сбалансированном солевом растворе (Эрла или Хенкса) до конечной концентрации 10% и последовательно фильтровали через мембранные фильтры (Sartorius, Германия) с диаметром пор 0,45 и 0,22 мкм. Полученный раствор разбавляли стерильным сбалансированным солевым раствором до необходимой концентрации. Уровень рН корректировали до значения $7,2 \pm 0,2$ с помощью раствора гидроксида натрия в концентрации 0,1 моль/л или ацетатного буферного раствора (рН 4,5) в концентрации 0,1 моль/л.

Ростовые свойства питательной среды проверяли при выращивании клеток млекопитающих в течение 5

последовательных пассажей, оценивая рост через 3, 5 и 7 суток [15]. Посевная концентрация клеток составляла $(5 \pm 2) \times 10^4$ клеток в 1 мл питательной среды. По окончании инкубации клетки удаляли с поверхности флакона смесью 0,25%-ного раствора трипсина и 0,2% раствора версена в соотношении 1:2, окрашивали 0,025%-ным раствором трипанового синего и в камере Горяева подсчитывали количество клеток. Затем определяли индекс пролиферации — отношение конечной концентрации клеток к исходной.

Уровень накопления вируса бешенства в культуральной среде оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора для диагностики вируса бешенства (ФГУ «ФЦТРБ ВНИВИ», Казань) [3]. Результаты регистрировали с использованием спектрофотометра (BioRad, США) при длине волны 490 нм.

Для оценки уровня накопления вируса бешенства в клеточной цитоплазме использовали метод иммунофлуоресценции [1, 16] с применением диагностического антирабического иммуноглобулина, меченного ФИТЦ (ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия).

Результаты обрабатывали общепринятыми статистическими методами. При расчете титра вируса в клетках применяли метод Рида и Менча [16]. Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента [8].

Результаты и обсуждение

Полученный ферментативный гидролизат фибрина представляет собой растворимый в воде мелкодисперсный порошок с желтым или кремовым оттенком. Время растворения 1 г белкового гидролизата в 10 мл дистиллированной воды не превышало 3 минут. Раствор гидролизата 1% концентрации имел рН от 6,5 до 6,9. Массовая доля общего азота составила $7,5 \pm 0,3$ %; массовая доля аминного азота — $2,8 \pm 0,2$ %; коэффициент протеолиза — $50,7 \pm 1,68$ %; содержание пептона по шкале Дифко составляло $53,67 \pm 1,53$ %; следы белка отсутствовали; массовая доля сухого остатка — $10,7 \pm 0,2$ %; содержание хлоридов — $0,2 \pm 0,05$ %; влажность — $2,4 \pm 0,2$ %.

Для установления оптимальной концентрации белковой основы приготавливали питательные среды, содержащие 0,05, 0,1, 0,25, 0,5% гидролизата фибрина. Питательная среда, полученная на основе гидролизата фибрина, представляла собой прозрачную жидкость красно-оранжевого или красного цвета без опалесцен-

ции и осадка. К полученному раствору добавляли 10% сыворотки КРС.

При оценке пригодности экспериментальной среды для культивирования клеточных культур первый пассаж проводили на смеси экспериментальной среды и среды Игла МЕМ, взятых в соотношении 1:1. Со второго

по пятый пассаж культивирование клеточных культур осуществляли только на экспериментальной среде.

Характеристика роста монослойной культуры перевиваемых линий Vero и ВНК-21 при выращивании на экспериментальных и контрольных питательных средах приведена в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика роста клеточных культур Vero и ВНК-21 на питательных средах

| Клеточная культура | Питательная среда* | Время культивирования, сут. | Индекс пролиферации | |
|--|--|--|---------------------|---------|
| Vero | Экспериментальная среда, содержащая 0,05% основы гидролизата фибрина | 3 | 1,2±0,3 | |
| | | 5 | 4,6±0,4 | |
| | | 7 | 5,2±0,3 | |
| | Экспериментальная среда, содержащая 0,10% основы гидролизата фибрина | 3 | 7,3±0,3 | |
| | | 5 | 15,2±0,2 | |
| | | 7 | 18,2±0,4 | |
| | Экспериментальная среда, содержащая 0,25% основы гидролизата фибрина | 3 | 6,4±0,3 | |
| | | 5 | 14,8±0,3 | |
| | | 7 | 18,4±0,3 | |
| | Экспериментальная среда, содержащая 0,50% основы гидролизата фибрина | 3 | 3,6±0,2 | |
| | | 5 | 5,3±0,4 | |
| | | 7 | 12,4±0,3 | |
| | Среда Игла МЕМ (контрольная среда) | 3 | 6,8±0,4 | |
| | | 5 | 15,0±0,3 | |
| | | 7 | 17,0±0,4 | |
| | ВНК-21 | Экспериментальная среда, содержащая 0,05% основы гидролизата фибрина | 3 | 1,8±0,1 |
| | | | 5 | 4,6±0,3 |
| | | | 7 | 4,8±0,3 |
| Экспериментальная среда, содержащая 0,10% основы гидролизата фибрина | | 3 | 6,4±0,3 | |
| | | 5 | 12,6±0,4 | |
| | | 7 | 15,3±0,4 | |
| Экспериментальная среда, содержащая 0,25% основы гидролизата фибрина | | 3 | 5,9±0,3 | |
| | | 5 | 13,4±0,3 | |
| | | 7 | 15,0±0,4 | |
| Экспериментальная среда, содержащая 0,50% основы гидролизата фибрина | | 3 | 3,2±0,3 | |
| | | 5 | 7,2±0,2 | |
| | | 7 | 10,6±0,3 | |
| Среда Игла МЕМ (контрольная среда) | | 3 | 5,2±0,2 | |
| | | 5 | 13,0±0,3 | |
| | | 7 | 15,5±0,4 | |

Примечание: * – экспериментальные и контрольные питательные среды, указанные в таблице 1, дополнительно содержали 10% сыворотки КРС

Значения индекса пролиферации, а также сроки образования и сохранения монослоя клеточных культур, выращенных на экспериментальных средах, содержащих 0,1 и 0,25% сухого гидролизата фибрина, а также культур, выращенных на контрольной среде, были практически идентичны. Образование конфлюэнтного монослоя при использовании указанных сред происходило к 5 суткам наблюдения. К 7–8 суткам отмечали сохранение конфлюэнтного монослоя клеточных культур, культивируемых на экспериментальных средах. В контрольных образцах к указанному сроку появлялись начальные признаки отмирания культуры. Уменьшение содержания гидролизата фибрина до 0,05% приводило к снижению индекса пролиферации и отсутствию формирования сплошного монослоя в течение срока наблюдения. При увеличении концентрации гидролизата фибрина до 0,5% также имело место снижение индекса пролиферации, но при этом отмечали более длительное сохранение монослоя.

Следует отметить, что при использовании сред с содержанием гидролизата фибрина 0,5% отмечали образование количества клеток, отличающихся от нормаль-

ной морфологии. После первых суток культивирования около 10–15% клеток приобретали длинные отростки, практически все клетки имели сильно вытянутую форму, которая сохранялась и после образования конфлюэнтного монослоя. Подобный характер роста отмечали как при выращивании клеток Vero, так и ВНК-21. При этом клетки Vero и ВНК-21, выращенные в экспериментальных средах с содержанием 0,05, 0,1 и 0,25% сухого гидролизата фибрина, сохраняли форму, характерную для каждого вида клеток, с четко выраженными границами, без признаков дегенерации, и морфологически не отличались от клеток, выращенных на контрольных средах.

После пятикратного пассирования клеточных культур Vero и ВНК-21 на экспериментальных средах исследовали репродуктивную активность вируса бешенства штамма «Москва 3253» в клетках указанных линий. Для исследования применяли экспериментальные среды, содержащие 0,1 и 0,25% сухого гидролизата фибрина, с добавлением 2 и 5% сыворотки КРС. В качестве контрольной среды использовали среду 199 с добавлением 5% сыворотки КРС. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика репродукции вируса бешенства штамма «Москва 3253» в клетках Vero и ВНК-21, выращенных на экспериментальных средах

| Клеточная культура | Питательная среда | Время культивирования, сут. | \log_2 титра вируса в ИФА | lg титра вируса в реакции иммунофлуоресценции |
|--------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|---|
| Vero | Экспериментальная среда, содержащая 0,10% основы гидролизата фибрина с добавлением 2% сыворотки КРС | 4 | 2,6±0,4 | 4,47±0,14 |
| | | 7 | 3,7±0,4 | 4,78±0,15 |
| | Экспериментальная среда, содержащая 0,10% основы гидролизата фибрина с добавлением 5% сыворотки КРС | 4 | 3,3±0,4 | 4,47±0,14 |
| | | 7 | 4,0±0,3 | 4,84±0,17 |
| | Экспериментальная среда, содержащая 0,25% основы гидролизата фибрина с добавлением 2% сыворотки КРС | 4 | 2,7±0,3 | 4,47±0,17 |
| | | 7 | 4,3±0,4 | 4,9±0,14 |
| | Экспериментальная среда, содержащая 0,25% основы гидролизата фибрина с добавлением 5% сыворотки КРС | 4 | 4,0±0,3 | 4,78±0,13 |
| | | 7 | 5,3±0,4 | 4,9±0,21 |
| | Среда 199 с добавлением 5% сыворотки КРС (контрольная среда) | 4 | 3,3±0,4 | 4,31±0,14 |
| | | 7 | 4,6±0,4 | 4,47±0,11 |
| ВНК-21 | Экспериментальная среда, содержащая 0,10% основы гидролизата фибрина с добавлением 2% сыворотки КРС | 4 | 2,3±0,3 | 4,0±0,14 |
| | | 7 | 3,6±0,4 | 4,45±0,14 |
| | Экспериментальная среда, содержащая 0,10% основы гидролизата фибрина с добавлением 5% сыворотки КРС | 4 | 3,0±0,3 | 4,23±0,17 |
| | | 7 | 4,0±0,4 | 4,57±0,14 |
| | Экспериментальная среда, содержащая 0,25% основы гидролизата фибрина с добавлением 2% сыворотки КРС | 4 | 3,0±0,4 | 3,92±0,15 |
| | | 7 | 4,4±0,4 | 4,21±0,19 |
| | Экспериментальная среда, содержащая 0,25% основы гидролизата фибрина с добавлением 5% сыворотки КРС | 4 | 3,3±0,4 | 4,18±0,14 |
| | | 7 | 4,3±0,3 | 4,64±0,21 |
| | Среда 199 с добавлением 5% сыворотки КРС (контрольная среда) | 4 | 3,0±0,3 | 4,31±0,14 |
| | | 7 | 4,3±0,4 | 4,54±0,21 |

Исследование репродуктивной активности вируса на клетках Vero и ВНК-21, выращенных в экспериментальных и контрольных средах, при множественности инфекции 0,1–0,5 ИД₅₀ на 1 клетку, показало сопоставимый уровень накопления вируса в сравниваемых средах. Более того, при культивировании вируса на клетках Vero, выращенных в экспериментальной среде, обнаружена тенденция к увеличению накопления внутриклеточного вируса бешенства. Следует отметить, что уменьшение количества сыворотки КРС в экспериментальной питательной среде до 2% не оказывало заметного влияния на репродукцию вируса бешенства штамма «Москва 3253».

Заключение

Проведенное исследование показало, что питательная среда, содержащая от 0,1 до 0,25% ферментативного гидролизата фибрина, может успешно применяться для культивирования перевиваемых клеток Vero и ВНК-21, а также накопления в них вирусов, в частности, вируса бешенства штамма «Москва 3253». Использование предлагаемой питательной среды позволит обеспечить рациональную утилизацию отходов, образующихся при производстве иммунобиологических препаратов.

Литература

1. Баркова И.П., Нагиева Ф.Г., Никулина В.Г., Лисаков А.Н. Быстрый культуральный метод для индикации антигенов вируса бешенства в инфицированных клеточных культурах // Инфекция и иммунитет. — 2013. — Т. 3. — № 4. — С. 323–326.
2. Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Кузнецова Е.М., Холматов К.И., Бибииков Д.Н., Никифоров А.К. Жидкая питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба // Проблемы особо опасных инфекций. — 2017. — № 2. — С. 81–83.
3. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Свинцов Р.А. Крупномасштабное культивирование фиксированного вируса бешенства штамма Москва 3253 на перевиваемой линии клеток Vero (B): методы и сравнительный анализ // Биотехнология. — 2014. — № 5. — С. 38–43.
4. Государственная Фармакопея Российской Федерации, издание XII, ч. I. — М., 2008. — 704 с.
5. Данлыбаева Г.А., Мазуркова Н.А., Матюшина Р.О., Трошкова Г.П., Подчерняева Р.Я. Питательная среда на основе гидролизата рисовой муки для культивирования клеток и определения чувствительности к вирусам гриппа // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2009. — № 2. — С. 113–116.
6. Жулидов И.М., Абрамова Е.Г., Антонычева М.В., Никифоров А.К., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Вахрушина Н.И., Еремин С.А., Аленкина Т.В. Биотехнологические аспекты переработки фибрина — отхода производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 3. — С. 17–23.
7. Крюкова Е.Н., Самуйленко А.Я., Ельников В.В., Красуткин С.Н., Литенкова И.Ю., Мельник Н.В., Боровой В.Н., Дресвянникова С.Г., Мельник Р.Н. Совершенствование технологии производства питательной среды для суспензионного культивирования клеток млекопитающих // Ветеринария Кубани. — 2016. — № 2. — С. 6–9.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
9. Мазуркова Н.А., Трошкова Г.П., Шишкина Л.Н., Ставский Е.А., Дроздов И.Г. Создание питательной среды на основе гидролизата сои, полученного с использованием бромелайна, для клеток MDCK и Vero и оценка в них ростовых свойств вакцинных штаммов вируса гриппа // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2011. — № 1. — С. 86–90.
10. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания МУ 4.2.2316-08. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. — 67 с.
11. Методы контроля медицинских иммунологических препаратов, вводимых людям: Методические указания МУ 4.1/4.2588-96. — М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998. — 128 с.
12. Никифоров А.К., Антонычева М.В., Волох О.А., Еремин С.А., Киреев М.Н., Жулидов И.М., Алешина Ю.А., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Холматов К.И. Разработка питательных сред на основе непищевого сырья для глубинного культивирования штаммов холерного вибриона // Проблемы особо опасных инфекций. — 2015. — № 1. — С. 85–88.
13. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты: Получение, состав, применение. — М.: Аграрная наука, 2000. — 295 с.
14. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. Фармакопейная статья ФС 42-3874-99. — М.: Фармакопейный государственный комитет, 2000. — 77 с.
15. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. — М.: Бином, 2014. — 718 с.
16. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. — Geneva, Switzerland: WHO, 1996. — 476 p.

DEVELOPMENT OF A CULTURE MEDIUM BASED ON FIBRIN HYDROLYZATE FOR THE CULTIVATION OF VERO AND BHK-21 CELL CULTURES AND REPRODUCTION OF THE RABIES VIRUS

S.V. GENERALOV, I.M. ZHULIDOV, M.V. ANTONYCHEVA, K.I. KHOLMATOV,
Yu.K. GAVRILOVA, E.G. ABRAMOVA, A.D. BELOUSOV, E.A. USACHEV

Russian Anti-Plague Research Institute «Microbe», Saratov

A nutrient medium based on enzymatic fibrin hydrolyzate has been developed for the cultivation of mammalian cells, in particular, the Vero and BHK-21 cell lines, and the accumulation of viruses in them, in particular, the attenuated rabies virus strain «Moscow 3253». When cultured on the proposed medium, Vero and BHK-21 cells retained proliferative activity and morphological features characteristic of each cell type. A comparable level of virus accumulation on Vero and BHK-21 cells was established using experimental and control nutrient media.

Keywords: nutrient medium, fibrin hydrolyzate, transplantable cell culture, rabies virus.

ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ЖИВЫХ ВАКЦИН

А.В. КОМИССАРОВ^{1,2*}, Д.Н. БИБИКОВ¹, О.А. ВОЛОХ¹, С.А. БАДАРИН¹, Н.В. СИНИЦЫНА¹,
Н.И. КОСТЫЛЕВА¹, В.Г. GERMANЧУК¹, А.К. НИКИФОРОВ^{1,2}

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»,

²Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов

Представлен обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященный вопросам лиофилизации живых вакцин. Обсуждены данные о качественном и количественном составе вспомогательных веществ (сред высушивания), используемых при лиофилизации вакцин. Изложены сведения об этапах лиофилизации и рассмотрены их особенности. Проанализировано воздействие процесса герметизации первичной упаковки непосредственно в камере лиофилизатора на качество препаратов. Дано представление о вспомогательных веществах, используемых при сублимационном высушивании. На ряде примеров показано влияние технологических параметров процесса лиофилизации на качество препаратов. Проведенный анализ данных литературы позволяет учесть влияние описанных в обзоре параметров при разработке технологии производства иммунобиологических препаратов для диагностики и профилактики инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: лиофилизация, живые вакцины, среды высушивания, технологические параметры.

Хранение живых вакцин в жидкой форме, как правило, приводит к быстрому снижению количества живых микроорганизмов и, соответственно, уменьшению ключевого показателя — иммуногенности до неприемлемых значений. Одним из путей сохранения целевых свойств живых вакцин является получение их в твердой лекарственной форме посредством сублимационного высушивания. Еще в 1890 году сообщалось о том, что биологические образцы могут быть сохранены высушиванием в условиях вакуума и при температуре ниже 0 °С [52]. Первые известные документальные доказательства использования сублимационной сушки для получения живых вакцин касаются противосыпной вакцины и датируются 1909 годом [67]. На данный момент основная часть коммерческих живых вакцин, производимых в твердой форме, получены с использованием лиофилизации.

Между тем обезвоживание препаратов сублимационным высушиванием, которое возможно назвать совокупностью процедур заморозки и удаления влаги вакуумом, способно отрицательно воздействовать на целевые свойства живых вакцин. Следует отметить, что

сублимационное высушивание, как и большинство других технологических процедур, требует в большинстве случаев оптимизации. Однако, как правило, технологические параметры проведения рассматриваемого процесса подбираются методом случайного подбора. В итоге это может привести к пониженной эффективности, в основном к необоснованному удлинению времени проведения указанной технологической процедуры, что ведет к увеличению цены препарата.

Лиофилизация живых культур микроорганизмов является одним из основных методов их сохранения при продолжительном хранении в коллекционных центрах [36]. Однако не всегда технологические приемы, применяемые в сублимационном высушивании этих препаратов, могут быть применены для высушивания живых вакцин в связи с тем, что по нормативной документации такие препараты должны сохранять определенное количество жизнеспособных клеток. Так, к примеру, для живой туберкулезной вакцины данный показатель составляет не менее 40%. В коллекционных культурах, как правило, задачей ставится следующее: «...Даже единичные живые клетки, сохранившиеся в сухих препаратах, после подтверждения их аутентичности могут быть использованы для получения следующей генерации штамма» [13]. В связи с вышеуказанным в настоящем обзоре не представлена информация по лиофилизации штаммов микроорганизмов, не относящихся к вакцинным.

Принято процедуру лиофилизации разделять по следующим основным стадиям: заморозка, первичное

© 2018 г. Комиссаров А.В., Бибииков Д.Н., Волох О.А., Бадарин С.А., Сеницына Н.В., Костылева Н.И., Германчук В.Г., Никифоров А.К.

* Автор для переписки:

Комиссаров Александр Владимирович
доктор биол. наук, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

E-mail: Komissarov-9@yandex.ru

высушивание (сублимация) и вторичное высушивание (десорбция).

Процессы, протекающие на стадии заморозки, устанавливают структуру продукта. Она, в свою очередь, определяет ход остальных этапов сушки, а в ряде случаев — требуемые свойства полученного вещества [14, 65, 69]. На текущий момент определено, что заморозка протекает по двум путям отвердевания: кристаллизация, основной особенностью которой служит организованность молекул, и аморфизация, которая обладает пространственной дезориентацией. Надо указать на то, что иногда для вещества характерны все перечисленные пути отвердевания [54, 65, 69]. Структура замороженного продукта напрямую определяет интенсивность сушки при сублимации и десорбции [66].

В промышленных технологиях сублимационного высушивания заморозка производится в основном установкой емкостей с продуктом на полку лиофилизационной камеры с дальнейшим доведением ее температуры, а значит, и продукта, до требуемой, используя, как правило, линейное уменьшение температуры [49, 56]. Общепринято, что кристаллизация протекает по двум фазам: образование кристаллов, а также их увеличение. Образование кристаллов определяется, главным образом, количеством твердой субстанции в жидкости и начинается при установлении криоскопической температуры, являющейся характерной у отдельного продукта [54]. Вследствие большего уменьшения температуры происходит вымораживание жидкости и увеличение ледяных кристаллов. Это приводит к сгущению имеющихся твердых компонентов и уменьшает температуру плавления неотвердевшей жидкости [53].

В криобиологии для процессов заморозки, происходящих по пути кристаллизации, существует понятие температуры эвтектики. Под ней подразумевают наименьшее значение данного параметра, при котором определенная доля замораживаемого продукта еще находится в жидком состоянии. Последующее уменьшение, в основном, на 2–10 °С, дает абсолютную кристаллизацию несвязанной влаги [54, 69]. Для процессов замерзания продукта, протекающих по механизму аморфизации, введено понятие температуры стеклования, которое характеризуется наибольшим сгущением твердой фракции [54]. Аналогично вышеназванному факту последующее уменьшение, также, в основном, на 2–10 °С, дает полную заморозку несвязанной влаги. В любом случае в отвердевшем веществе имеется порядка 5–20% неотвердевшей влаги, которая прочно связана с твердыми компонентами раствора различными силами [14, 69].

Первичное высушивание (при нем основное количество отвердевшей влаги выводится из вещества сублимацией) начинается за счет создания давления разрежения в сушильной установке. Его побудительной силой служит отличие значений давления паров влаги отвердевшего вещества и сушильной установки. Показано, что вакуум в сушильной установке следует создавать ниже давления насыщенных паров отвердевшего вещества. Это является условием обеспечения операции перемещения несвязанной жидкости из замороженного положения в пар, без жидкой стадии. Обратная процедура происходит в конденсаторе сушильной установки, температура которого лежит в пределах от минус 60–80 °С, что на 20–40 °С меньше аналогичного показателя в отсеке лиофилизации [51, 53, 78]. Интенсивность сублимации определяется рядом факторов, к главным из которых можно отнести:

- высоту лиофилизируемого продукта, при этом имеется обратная зависимость между этими характеристиками [69];
- порозность отвердевшего вещества, зависящую, как правило, от температурно-временных характеристик процедуры замораживания [54];
- площадь лиофилизируемого вещества, при этом зависимость является практически прямо пропорциональной [14];
- температуру греющих полок, а соответственно, и продукта. При увеличении данной характеристики интенсивность сублимации повышается [30].

Общепринятым является утверждение о том, что продолжительность этапа сублимации, при котором происходит удаление до 90% всей влаги, определяется высотой лиофилизируемого продукта в первичной упаковке; здесь имеется обратная зависимость между этими характеристиками, а также результат обуславливается качественно-количественным составом вспомогательных веществ и температурой продукта. Что касается последнего фактора, то надо учитывать следующее обстоятельство: необходимо, чтобы температура продукта не превышала значений температуры его эвтектики или стеклования. Невыполнение этого условия может привести к полному или частичному оттаиванию лиофилизируемого вещества и возникновению эффекта коллапса. По данным Нежуты А.А. с соавт., высота высушиваемого препарата должна составлять не более 12 мм, что позволяет предотвратить появление вышеназванного фактора, а также избежать снижения остаточной влаги ниже критических значений и повреждения бактерий [32]. Нужно сказать и о том, что область эвтектики или стеклования является индивидуальной для каждого продукта.

Это, в свою очередь, по мнению Tang X. et al., приводит к увеличению остаточной влажности и ухудшению целевых характеристик лиофилизатов [69].

При отборе всей отвердевшей несвязанной влаги сублимация прекращается. Для десорбции связанной влаги прибегают к увеличению температуры продукта до установления требуемого уровня остаточной влаги. Интенсивность десорбции зависит от интенсивности диффузии влаги. Исследователями выявлено, что уровень остаточной влаги определяется температурой процедуры десорбции и площадью продукта, а также не определяется величиной вакуума в сушильной установке и высотой лиофилизируемого вещества [51]. Можно сказать, что задача выбора температурно-временных параметров лиофилизации имеет важное значение. Недостаточный нагрев продукта приводит к удлинению лиофилизации, а избыточный — может привести к оттаиванию вещества и возможной порче продукта. Принято положение том, что максимальная жизнеспособность микроорганизмов обеспечивается в состоянии глубокого анабиоза, при этом основным показателем достижения такого состояния служит остаточная влажность препарата. Ефременко А.А. со ссылкой на ряд авторов констатирует, что для большинства микроорганизмов данный параметр должен находиться в пределах от 1 до 2% [17]. Так, исследованиями Будыки Д.А. выявлено, что для лиофилизированных клеток *Yersinia pestis* вакцинного штамма EV оптимальный показатель остаточной влажности составляет интервал от

1,5 до 2% [11]. Нежутой А.А. и Сербис Е.С. делается вывод о том, что рациональные температурно-временные режимы этапа десорбции и остаточная влажность для каждого вида биопрепаратов, в том числе живых вакцин, должны подбираться экспериментально [31].

Общепризнанным является факт, что на выживаемость микроорганизмов при их лиофилизации влияет качественный и количественный состав сред высушивания. Могилук В. в обзорной статье, посвященной ряду аспектов лиофилизации, все вспомогательные вещества, используемые при сублимационном высушивании, делит на несколько групп: наполнители — создание матрицы для основного вещества; буферные растворы — для контроля рН; регуляторы тоничности — для контроля осмотического давления; модификаторы структуры — для улучшения характеристик матрицы с целью лучшего преодоления сопротивления потоку пара; стабилизаторы — для защиты основного вещества от пересушивания и воздействия низких температур; ингибиторы разрушения — для повышения температуры, при которой может произойти разрушение структуры высушиваемого продукта [27]. Спектр применяемых вспомогательных веществ, а также их количественно-качественных соотношений достаточно широк. Мы позволили себе представить в виде таблицы наиболее употребительные, по данным Constantino H.R. & Pikal M.J. [51], вспомогательные вещества, используемые в процессах лиофилизации (табл. 1).

Таблица 1

Вспомогательные вещества, используемые в процессах лиофилизации

| Группа вспомогательных веществ | Наименование вспомогательных веществ |
|--------------------------------|--|
| 1 | 2 |
| Наполнители | Сахара (маннитол, сахароза, глюкоза, трегалоза, лактоза, сорбитол, рафиноза) Аминокислоты (глицин, аргинин, гистидин) Полимеры (декстран, полиэтиленгликоль) |
| Буферные растворы | Лимонная кислота, натрий лимоннокислый, калий лимоннокислый, винная кислота, натрий фосфорнокислый, трис-НСl, трис-ацетатный буфер, хлорид цинка, ацетат натрия, ацетат калия, аргинин |
| Регуляторы рН | Соляная кислота, гидроксид натрия |
| Регуляторы тоничности | Хлорид натрия, глицерол, маннитол, сахароза, глицин |
| Модификаторы структуры | Маннитол, поливинилпирролидон |
| Стабилизаторы | Сахароза, глюкоза, трегалоза, маннит, манноза, лактоза, декстран, гидроксипроцерамид, полиэтиленгликоль, полисорбаты (полисорбат-20, полисорбат-80), глицин, аргинин, лейцин, серин, натрия глутамата моногидрат |
| Ингибиторы разрушения | Декстран, желатин, гидроксипроцерамид, фиколл (полисахароза) |

Признано, что хранение лиофилизированных микроорганизмов в условиях вакуума или в среде инертного газа обеспечивает их большую выживаемость в сравнении с теми препаратами, которые были загерметизированы в первичной упаковке в условиях доступа атмосферного воздуха [36].

В качестве первичной упаковки лиофилизированных лекарственных препаратов используют в основном ампулы и флаконы. При этом следует отметить, что в последнее время предпочтение отдается последним [19, 23]. На наш взгляд, это, в первую очередь, объясняется следующими причинами. Технология герметизации ампул с препаратом после лиофилизации предусматривает их выгрузку из сушильного аппарата с последующим запаиванием. Во время выполнения этих операций может произойти контаминация образцов. Предотвратить появление подобных ситуаций представляется возможным разработкой технологии лиофилизации во флаконах на сублимационном сушильном оборудовании, позволяющем производить операции герметизации первичной упаковки непосредственно в камере лиофилизатора.

Анализ данных Государственного реестра лекарственных средств показал, что из 300 наименований лиофилизированных лекарственных средств (по состоянию на конец 2016 г.) у более чем 90% из них в качестве потребительской упаковки используются флаконы. Нашими исследованиями показано, что при переходе произ-

водства лиофилизаторов от ампул к флаконам существенно снижается количество брака препаратов по критерию герметичности [23].

Следует отметить, что имеются работы по приготовлению сублимационно высушенных препаратов в шприцах [19, 60, 71]. Без сомнения, что данная форма выпуска является наиболее удобной для практического использования в здравоохранении, но лишь только в том случае, если все количество препарата является одной человеко-дозой.

Рассмотрение данных Государственного реестра лекарственных средств выявило, что из 87 наименований живых вакцин, используемых для вакцинации людей, в форме лиофилизата производится 25 наименований. Живых вакцин для ветеринарии, в соответствии с информацией, представленной на сайте Россельхознадзора России, выпускается 360 препаратов, а в сухой форме — 270 наименований.

Мы позволили себе обобщить данные, касающиеся процесса лиофилизации, по живым вакцинам, используемым для вакцинации людей (табл. 2). При систематизации данных использовали информацию по препаратам, имеющуюся в Государственном реестре лекарственных средств, в Государственной Фармакопее России [12], а также представленную производителями. Кроме того, посчитали нужным представить доступную информацию о живых вакцинах в форме лиофилизата, производимых в США (табл. 3) [68].

Таблица 2

Сведения о живых вакцинах в форме лиофилизата, производимых в России

| Наименование вакцины | Производитель | Состав | | Форма выпуска, герметизация, остаточная влажность |
|---|-----------------------------|--|--|---|
| | | Активный компонент | Вспомогательные вещества | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Риккетсиозные вакцины | | | | |
| Вакцина Ку-лихорадки М-44 живая (Вакцина Ку-лихорадки М-44) | АО «НПО «Микроген» (Россия) | Одна прививочная доза (0,05 мл) — от 5×10^7 до 5×10^9 минимальных инфицирующих доз (МИДэ) коксидел Бернета для куриных эмбрионов | Сахароза — 1%, молоко питьевое пастеризованное — 49% | 10 доз (1,0 мл) в ампуле вместимостью 6 мл, запаянных под вакуумом. Остаточная влажность — не более 3,0% |
| Вакцина Е сыпно-тифозная комбинированная живая (ЖКСВ-Е) | АО «НПО «Микроген» (Россия) | Живые риккетсии Провачека аттенуированного вакцинного штамма Е-1000 — не менее 100000 минимальных инфицирующих доз для куриных эмбрионов (МИДэ), растворимый антиген из риккетсий Провачека вирулентного штамма Брейнль — не менее 16 антигенных единиц (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,25 мл) | Молоко коровье обезжиренное — 50% | По 20 прививочных доз (1,0 мл) в ампуле вместимостью 6 мл, запаянной под вакуумом. Остаточная влажность — не более 3,0% |

| Наименование вакцины | Производитель | Состав | | Форма выпуска, герметизация, остаточная влажность |
|--|--|---|---|---|
| | | Активный компонент | Вспомогательные вещества | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Вирусные вакцины | | | | |
| Варилрикс (вакцина против ветряной оспы живая аттенуированная) | ЗАО «ГлаксоСмитКляйн Трейдинг» (Россия) | Живой аттенуированный вирус <i>Varicella zoster</i> (штамм Ока), со специфической активностью (не менее) 3,3 lg БОЕ | Сывороточный альбумин человека — стабилизатор 1 мг, неомицина сульфат менее 25 мкг, лактоза 32 мг, сорбитол 6 мг, маннитол 6 мг, аминокислоты 8 мг | По 0,5 мл (1 доза) во флакон прозрачного бесцветного стекла вместимостью 3 мл, укуренный пробкой из резины и алюминиевым колпачком под обкатку с отрывным язычком, загерметизированных в среде инертного газа. Остаточная влажность — не более 2,5% |
| Вакцина гриппозная живая моновалентная «Инфлювир» | АО «НПО «Микроген» (Россия) | Вакцинный штамм вируса гриппа типа А/17/Калифорния/2009/38 (H ₁ N ₁) — не менее 10 ^{7,0} ЭИД ₅₀ | Сахароза — 15 мг, лактозы моногидрат — 6 мг, натрия глутамата моногидрат — 3 мг, триметамол — 0,3 мг, натрия хлорид — 0,3 мг, желатин — 0,3 мг (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | По 1,2 или 3 дозы (0,5 мл) в ампулах вместимостью 2 мл или по 6 доз (1,0 мл) в ампулах вместимостью 5 мл, запаянных в среде инертного газа (аргон). Остаточная влажность — не более 2,5% |
| Вакцина гриппозная аллантоисная живая «Ультравак» | АО «НПО «Микроген» (Россия) | Реассортантный вирус гриппа подтипов А/H ₁ N ₁ / и А/H ₃ N ₂ / — не менее 10 ^{6,9} ЭИД ₅₀ ; реассортантный вирус гриппа тира В — не менее 10 ^{6,4} ЭИД ₅₀ (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | Сахароза — 15 мг, лактозы моногидрат — 6 мг, натрия глутамата моногидрат — 3 мг, триметамол — 0,3 мг, натрия хлорид — 0,3 мг, желатин — 0,3 мг (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | В ампулах вместимостью 2 мл по 1 дозе (0,5 мл), запаянных в среде инертного газа. Остаточная влажность — не более 2,5% |
| Вакцина гриппозная живая «Ультрагравак» | АО «НПО «Микроген» (Россия) | Вакцинный штамм вируса гриппа тира А — не менее 10 ^{7,0} ЭИД ₅₀ (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | Сахароза — 15 мг, лактозы моногидрат — 6 мг, натрия глутамата моногидрат — 3 мг, триметамол — 0,3 мг, натрия хлорид — 0,3 мг, желатин — 0,3 мг (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | В ампулах вместимостью 2 мл по 1 дозе (0,5 мл) или в ампулах вместимостью 5 мл по 6 доз (1,0 мл), запаянных в среде инертного газа. Остаточная влажность — не более 2,5% |
| Вакцина желтой лихорадки живая | ФГБУ «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН» (Россия) | Вирус желтой лихорадки не менее 1000 ЛД ₅₀ или 1600 БОЕ (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | Лактозы моногидрат — 20 мг (стабилизатор), сорбитол — 10 мг (стабилизатор), L-гистидин — 1,2 мг (стабилизатор), L-аланин — 0,7 мг (стабилизатор) (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | В ампулах вместимостью 3 мл по 2,5, 10 доз, запаянных в среде инертного газа. Остаточная влажность — не более 2,5% |
| Вакцина против краснухи культуральная живая аттенуированная | АО «НПО «Микроген» (Россия) | Вирус краснухи штамм RA27/3 — не менее 1000 ТЦД (тканевых цитопатических доз) (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | Сорбитол — 12,5 мг, желатин — 6,25 мг, L-аргинина гидрохлорид — 4 мг, мальтоза — 2,5 мг, натрия хлорид — 1,4 мг, лактальбумина гидролизат — 1,12 мг, L-аланин — 0,5 мг, неомицина сульфат — не более 25 мкг (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | В ампулах вместимостью 2 мл по 1 дозе (0,5 мл), запаянных в среде инертного газа (аргон). Остаточная влажность — не более 2,0% |
| Вакцина против краснухи живая аттенуированная | Серум Инститьют оф Индия Лтд (Индия) | Не менее 1000 тканевых цитопатогенных доз (ТЦД ₅₀) вакцинного штамма вируса краснухи Вистар RA 27/7 (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | Сорбитол — 25 мг, желатоза — 12,5 мг (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | По 1 или 10 доз во флаконе вместимостью 3 мл темного стекла, загерметизированных в среде инертного газа. Остаточная влажность — не более 2,0% |
| Вакцина оспенная живая | АО «НПО «Микроген» (Россия) | Вирус осповакцины — не менее 10 ⁶ оспообразующих единиц (ООЕ) (состав приведен на одну прививочную дозу) | Пептон — в конечной концентрации 5–10% (состав приведен на одну прививочную дозу) | По 20 доз (0,2 мл) в ампуле вместимостью 1 мл, запаянных в среде азота. Остаточная влажность — не более 3,0% |

| Наименование вакцины | Производитель | Состав | | Форма выпуска, герметизация, остаточная влажность |
|--|--|---|---|---|
| | | Активный компонент | Вспомогательные вещества | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Вакцина коревая культуральная живая | АО «НПО «Микроген» (Россия) | Не менее 1000 тканевых цитопатогенных доз (ТЦД ₅₀) вакцинного штамма вируса кори Ленинград-16 (Л-16) (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | Стабилизатор — смесь 0,01 мл 10 % раствора желатины и 0,04 мл водного раствора ЛС-18 (сахароза — 250 мкг, лактоза — 50 мг, глицин — 25 мг, L-пролин — 25 мг, Хенкса сухая смесь с феноловым красным — 7,15 мг, вода для инъекций до 1 мл), гентамицина сульфат — не более 10 мкг (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | В ампулах вместимостью 1 мл по 1 или 2 прививочные дозы (0,5 мл), запаянных под инертным газом (азот). Остаточная влажность — не более 2,0% |
| Вакцина коревая культуральная живая | ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Россия) | Не менее 1000 тканевых цитопатогенных доз (ТЦД ₅₀) вакцинного штамма вируса кори Ленинград-16 (Л-16) (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | Стабилизатор — смесь 0,001–0,002 г желатины и 0,04–0,08 мл водного раствора ЛС-18 (сахароза — 250 мкг, лактоза — 50 мг, глицин — 25 мг, L-пролин — 25 мг, Хенкса сухая смесь с феноловым красным — 7,15 мг, вода для инъекций до 1 мл). Или смесь по 0,005–0,01 г сорбита и желатозы, гентамицина сульфат — не более 10 мкг (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | По 1,2 и 5 прививочных доз в ампуле (флаконе) вместимостью 2 мл по 0,12 мл. Герметизация в среде инертного газа (аргон). Остаточная влажность — не более 2,0% |
| М-М-Р II (Вакцина против кори, краснухи и паротита, живая) | Мерк Шарп и Доум Б.В. (Нидерланды) | Вирус кори с низкой вирулентностью, полученный из аттенуированного (Enders') штамма Edmonston, не менее 1000 ТЦД ₅₀ ; вирус паротита, полученный из штамма Jeryl Lynn™ (уровень В), не менее 12500 ТЦД ₅₀ ; вирус краснухи, полученный из живого аттенуированного штамма WistarRA27/3 (WI-38), не менее 1000ТЦД ₅₀ (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | Натрия гидрофосфат — 2,2 мг, натрия дигидрофосфата моногидрат — 3,1 мг, натрия гидрокарбонат — 0,5 мг, среда 199 с солями Хенкса — 3,3 мг, среда МЕМ Игла — 0,1 мг, неомицина сульфат — 25 мкг, феноловый красный — 3,4 мкг, сорбитол — 14,5 мг, калия гидрофосфат — 30 мкг, калия дигидрофосфат — 20 мкг, желатин гидролизанный — 14,5 мг, сахароза — 1,9 мг, натрия L-глутамата моногидрат — 20 мкг (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | 1 доза во флаконе из бесцветного стекла вместимостью 3 мл. Флаконт закупорен пробкой серого бутилового или серого хлорбутилового каучука с покрытием В2-42 под алюминиевой обкаткой и закрыт отщелкивающейся пластиковой крышкой с контролем первого вскрытия. Герметизация в среде инертного газа. Остаточная влажность — не более 2,0% |
| Вакцина против краснухи живая аттенуированная | Институт иммунологии Инк (Хорватия) | Не менее 1000 тканевых цитопатогенных доз (ТЦД ₅₀) вакцинного штамма вируса краснухи Вистар RA 27/7 (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл) | Сорбитол, желатин, L-аргинина хлорид, мальтоза, натрия хлорид, лактаальбумина гидролизат, L-аланин, не более 25 мкг неомицина сульфата (состав приведен на одну прививочную дозу — 0,5 мл). Данные о количественном составе отсутствуют | Во флаконах вместимостью 3 мл, содержащих одну прививочную дозу (0,5 мл). Герметизация в среде инертного газа. Остаточная влажность — не более 2,0% |

| Наименование вакцины | Производитель | Состав | | Форма выпуска, герметизация, остаточная влажность |
|---|---|--|---|--|
| | | Активный компонент | Вспомогательные вещества | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Вакцина паротитная культуральная живая | АО «НПО «Микроген» (Россия) | Не менее 1000 тканевых цитопатогенных доз (ТЦД ₅₀) аттенуированного штамма вируса паротита Ленинград-2 (состав приведен на одну прививочную дозу – 0,5 мл) | Стабилизатор – смесь желатин и 0,08 мл водного раствора ЛС-18 (сахароза – 250 мкг, лактоза – 50 мг, глицин – 25 мг, L-пролин – 25 мг, Хенкса сухая смесь с феноловым красным – 7,15 мг, вода для инъекций до 1 мл), гентамицина сульфат – не более 20 мкг (состав приведен на одну прививочную дозу – 0,5 мл) | В ампулах вместимостью 2 мл по 1 или 2 прививочные дозы (0,5 мл), запаянных под инертным газом (азот). Остаточная влажность – не более 2,0% |
| Вакцина паротитно-коревая культуральная живая | АО «НПО «Микроген» (Россия) | Не менее 1000 тканевых цитопатогенных доз (ТЦД ₅₀) аттенуированного штамма вируса кори Ленинград-16; не менее 20000 тканевых цитопатогенных доз (ТЦД ₅₀) аттенуированного штамма вируса паротита Ленинград-3 (состав приведен на одну прививочную дозу – 0,5 мл) | Стабилизатор – смесь желатин и 0,08 мл водного раствора ЛС-18 (сахароза – 250 мкг, лактоза – 50 мг, глицин – 25 мг, L-пролин – 25 мг, Хенкса сухая смесь с феноловым красным – 7,15 мг, вода для инъекций до 1 мл), гентамицина сульфат – не более 20 мкг (состав приведен на одну прививочную дозу – 0,5 мл) | В ампулах вместимостью 2 мл по 1 прививочной дозе (0,5 мл), запаянных под инертным газом (азот). Остаточная влажность – не более 2,0% |
| Вакцина против кори, паротита и краснухи живая культуральная «Приорикс» | ЗАО «ГлаксоСмитКляйн Трейдинг» (Россия) | Живой аттенуированный вирус кори (штамм Schwarz) – не менее 3,0 lgТЦД ₅₀ , живой аттенуированный вирус паротита (штамм RIT4385) – не менее 3,7 lgТЦД ₅₀ , живой аттенуированный вирус краснухи (штамм Wistar RA 27/3) – не менее 3,5 lgТЦД ₅₀ (состав приведен на одну прививочную дозу – 0,5 мл) | Лактоза – 32 мг, сорбитол – 9 мг, маннитол – 8 мг, аминокислоты – 9 мг, неомицина сульфат – не более 25 мкг (состав приведен на одну прививочную дозу – 0,5 мл) | По 1, 10 доз во флаконе вместимостью 3 мл. Герметизация в среде инертного газа. Остаточная влажность – не более 2,0% |
| Вакцина против кори живая аттенуированная | Серум Инститют оф Индия Лтд (Индия) | Не менее 1000 тканевых цитопатогенных доз (ТЦД ₅₀) штамма вируса кори Edmopston-Zagreb (состав приведен на одну прививочную дозу – 0,5 мл) | Сорбитол – 25 мг, желатоза – 12,5 мг (состав приведен на одну прививочную дозу – 0,5 мл) | По 1 или 10 доз во флаконе вместимостью 3 мл темного стекла. Герметизация в среде инертного газа. Остаточная влажность – не более 2,0% |
| Вакцина против кори, паротита и краснухи живая аттенуированная | Серум Инститют оф Индия Лтд (Индия) | Не менее 1000 тканевых цитопатогенных доз (ТЦД ₅₀) штамма вируса кори Edmopston-Zagreb, не менее 1000 (ТЦД ₅₀) аттенуированного вируса паротита (штамм Wistar RA 27/3), не менее 1000 (ТЦД ₅₀) аттенуированного вируса краснухи (штамм L-Zagreb) (состав приведен на одну прививочную дозу – 0,5 мл) | Сорбитол – 5%, желатин – 2,5%, неомицина В сульфат – не более 2,5 мкг (состав приведен на одну прививочную дозу – 0,5 мл) | По 1 или 10 доз во флаконе вместимостью 3 мл темного стекла. Герметизация в среде инертного газа. Остаточная влажность – не более 2,0% |
| Бактериальные вакцины | | | | |
| Вакцина туберкулезная живая для щадящей первичной иммунизации (БЦЖ-М) | АО «НПО «Микроген» (Россия) | Микобактерии вакцинного штамма <i>Mycobacterium bovis</i> , субштамм BCG-1 (Russia) – 0,025 мг (состав приведен на одну прививочную дозу – 0,1 мл) | Натрия глутамата моногидрат – не более 0,15 мг (состав приведен на одну прививочную дозу – 0,1 мл) | По 20 прививочных доз (0,5 мл) в ампуле вместимостью 6 мл, запаянной под вакуумом. Остаточная влажность – не более 5,0% |

| Наименование вакцины | Производитель | Состав | | Форма выпуска, герметизация, остаточная влажность |
|------------------------------|--|---|--|--|
| | | Активный компонент | Вспомогательные вещества | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Вакцина чумная живая | ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (Россия) | Живые микробные клетки вакцинного штамма <i>Yersinia pestis</i> EV линии НИИЭГ (от 100 до 200 млрд микробных клеток в флаконе) | Лактоза (0,2 г во флаконе), декстрин (0,02 г во флаконе), тиомочевина (0,02 г во флаконе), аскорбиновая кислота (0,02 г во флаконе) | 2 мл в флаконе вместимостью 6 мл. Герметизация — под вакуумом. Остаточная влажность — не более 4,0% |
| Вакцина чумная живая | ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора» (Россия) | Живые микробные клетки вакцинного штамма <i>Yersinia pestis</i> EV линии НИИЭГ (1 подкожная доза — 300 млн живых микробных клеток в 0,5 мл) | Сахароза — 10%, желатин — 1%, тиомочевина — 1% | 2 мл в ампуле вместимостью 6 мл. Герметизация — под вакуумом. Остаточная влажность — не более 4,0% |
| Вакцина бруцеллезная живая | АО «НПО «Микроген» (Россия) | Живая культура вакцинного штамма <i>Brucella abortus</i> 19 BA — от 4×10^9 до $1,6 \times 10^{10}$ живых микробных клеток (состав приведен на 1 накожную дозу) | Сахароза — 15 мг, натрия глутамат моногидрат — 2,25 мг, тиомочевина — 0,75 мг, желатин — 2,25 мг (состав приведен на 1 накожную дозу) | По 1 мл (4–10 накожных доз) в ампуле вместимостью 6 мл, запаянных под вакуумом. Остаточная влажность — не более 3,0% |
| Вакцина туляреминая живая | АО «НПО «Микроген» (Россия) | Живая культура вакцинного штамма <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ — от $1,5 \times 10^8$ до $2,5 \times 10^8$ живых микробных клеток (состав приведен на 1 накожную дозу) | Сахароза — 0,0033 мг, натрия глутамат моногидрат — 0,00495 г, тиомочевина — 0,00165 г, желатин — 0,0033 г (состав приведен на 1 накожную дозу) | По 1 мл (15–50 накожных доз) в ампуле вместимостью 6 мл, запаянной под вакуумом. Остаточная влажность — не более 3,0% |
| Вакцина сибиреязвенная живая | ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (Россия) | Живая культура вакцинного штамма <i>Bacillus anthracis</i> СТИ-1: 20 человеко-доз для кожного или 200 человеко-доз для подкожного применения, содержит 9 ± 1 млрд спор | Сахароза — 10% раствор | По 1 мл: ампулы вместимостью 6 мл под вакуумом (срок годности — 4 года); ампулы вместимостью 6 мл без вакуума и флаконы вместимостью 6 мл (срок годности — 3 года). Остаточная влажность — не более 5,0% |

Таблица 3

Сведения о живых вакцинах в форме лиофилизата, производимых в США

| Наименование вакцины | Производитель | Вспомогательные вещества |
|---|---------------|--|
| 1 | 2 | 3 |
| Вакцина туберкулезная живая BCG vaccine | Merck | Глутамат натрия, хлористый натрий, PS80 (Полисорбат-80 (Твин-80)) |
| Вакцина туберкулезная живая Mucovax | Sanofi | Глицерин, аспарагин, сульфат магния, аммоний-железо (III) цитрат |
| Вакцина туберкулезная живая TICE BCG | Merck | Сахароза, фосфат аммония, PS80 (Полисорбат-80 (Твин-80)) |
| Вакцина против кори живая Attenuvax | Merck | Желатин, сыворотка альбумина человека, сорбитол, сахароза |
| Вакцина против кори, эпидемического паротита и краснухи живая M-M-R II | Merck | Желатин, сыворотка альбумина человека, сорбитол, сахароза, хлористый натрий |
| Вакцина против кори, эпидемического паротита, краснухи и вируса ветряной оспы ProQuad | Merck | Желатин, сыворотка альбумина человека, сорбитол, сахароза, хлористый натрий, глутамат натрия |
| Вакцина против эпидемического паротита Mumpsvax | Merck | Желатин, сыворотка альбумина человека, сорбитол, сахароза, хлористый натрий |
| Вакцина против краснухи Mequvax II | Merck | Желатин, сыворотка альбумина человека, сорбитол, сахароза, хлористый натрий |
| Вакцина оспенная живая ACAM2000 | Sanofi | Маннитол, сыворотка альбумина человека, хлористый натрий |
| Вакцина против ветряной оспы Varivax | Merck | Желатин, сахароза, хлористый натрий, глутамат натрия |
| Вакцина против желтой лихорадки YF-VAX | Sanofi | Сорбитол, желатин |
| Вакцина против ветряной оспы Zostavax | Merck | Желатин, сахароза, хлористый натрий, глутамат натрия |

Рассмотрение данных таблицы 2 позволяет сформулировать ряд выводов. Остаточная влажность для риккетсиозных вакцин составляет величину, не превышающую 3%, для вирусных вакцин этот показатель колеблется от 2 до 3%, для бактериальных вакцин — от 3 до 5%. Для всего спектра зарегистрированных на территории России живых вакцин характерна герметизация первичных упаковок, внутри которых отсутствует кислород; при этом применяется герметизация под вакуумом или в среде инертного газа. Особняком здесь стоит вакцина сибиреязвенная живая сухая, которая выпускается как под вакуумом, так и без него. Здесь следует отметить, что срок годности препарата без вакуума снижен с 4 до 3 лет. Для подавляющего большинства живых вакцин, производимых российскими компаниями, в качестве первичной упаковки используются ампулы; при этом все иностранные производители применяют флаконы. На наш взгляд, это свидетельствует об отсутствии у российских производителей живых вакцин оборудования, позволяющего использовать флаконы в качестве первичной упаковки. Высота лиофилизируемого продукта колеблется от 0,12 до 10 мм. Что касается сред высушивания, то можно заключить о существенном разнообразии как качественного, так и количественного их состава. В качестве примера можно привести состав сред высушивания для одного и того же препарата (вакцины чумной живой сухой), выпускаемых разными производителями.

Далее в нашей обзорной статье мы посчитали целесообразным привести сведения научной и патентной литературы по технологическим особенностям лиофилизации живых вакцин.

Авторами [45] анонсировано создание живой культуральной коревой вакцины для иммунизации детей. Технической задачей этого изобретения являлось расширение ассортимента коревых вакцин, создание вакцины стабильной при хранении и обеспечивающей при вакцинации длительный иммунитет. Разработанная вакцина представляет собой вирус кори штамм Ленинград-16 (Л-16) или (Л-16М) или Москва-5 (М-5), полученный в культуре клеток эмбрионов японских перепелов или перепелов линии «Фараон». Коровая вакцина содержит: сухую вирусную суспензию указанных штаммов с биологической активностью не ниже $2,51 \lg \text{TЦД}_{50}/0,5 \text{ мл}$; стабилизатор, представляющий собой смесь 50% раствора сорбита и 25% раствора желатозы или смесь стабилизатора ЛС-18 и 10% раствора желатина; антибиотик канамицина моносульфат или гентамицина сульфат до 20 ед. в дозе вакцины и аминокептид. Готовая вакцина

в сухом виде запаивается в ампулах или флаконах по одной, две или пять доз в объеме $0,1 \pm 0,012 \text{ мл}$ или $0,2 \pm 0,02 \text{ мл}$ и содержит не менее 1000 ТЦД.

Технологические аспекты лиофилизации препарата описаны ниже. В бутылку с вирусной жидкостью сначала в условиях вакуума вносят желатозу, а затем сорбит. При использовании стабилизатора ЛС-18 и желатина 10%-ного к объединенному вирусному сбору добавляют ЛС-18 и желатин 10% в соотношениях: на 500 мл вирусного сбора (16,5% сухой вирусной суспензии) добавляют 400 мл ЛС-18 и 100 мл желатина 10%-ного. Далее осуществляют замораживание разлитой в ампулы вакцины при температуре минус 30°C и сублимационное высушивание. При этом серии вакцины со стабилизатором сорбит-желатоза по окончании процесса замораживания камеру вакуумируют до остаточного давления не выше 10 Па (75 мкм рт. ст.). Высушивание производится без циркуляции теплоносителя. Длительность — 2 часа. Температура препарата на стадии сублимации не должна превышать минус 40°C . Общая длительность процесса сушки — 40–44 часа. Сушка предварительно замороженной вакцины со стабилизатором ЛС-18 осуществляется при давлении не выше 10 Па (75 мкм рт. ст.) без циркуляции теплоносителя, при температуре препарата на стадии сублимации не выше минус 40°C , длительность процесса сушки — 46–54 часа. Авторы декларируют, что за счет присутствия стабилизатора ЛС-18 вакцина приобретает термостабильность и имеет биологическую активность не ниже $2,5 \text{ ед. TЦД}_{50}/0,5 \text{ мл}$.

Известен способ получения микрокапсулированной формы коревой вакцины для перорального применения [37]. По вопросам, касающимся лиофилизации, представлена следующая информация. К стерильной жидкости живого вируса кори со специфической активностью не менее $5,2 \lg \text{TЦД}_{50}/0,5 \text{ мл}$ при непрерывном перемешивании одновременно с раствором сорбита добавляют стерильные водные растворы 25%-ной желатозы (мол. масса 3000) и полиэлектролита (альгинат натрия, или полиакриловая кислота, или сополимер акриловой кислоты, или смесь полиакриловой кислоты с поливинилпирролидоном в соотношении (0,5–2,0):1 до конечных концентраций 5,0 и 0,5 весовых процентов соответственно. Полученный жидкий полуфабрикат вакцины разливают в ампулы ВПШ-3 по 0,5 мл в каждую и замораживают при температуре минус 60°C в течение 18 часов. Продукт лиофильно высушивают в течение 48 часов в стерильных условиях. После окончания сушки ампулы заполняют инертным газом (аргоном), запаивают. По описанным методическим приемам раз-

работаны технология производства живой культуральной тривалентной вакцины против сезонного гриппа [34], опытно-промышленная технология производства живой культуральной вакцины «Вектор-Флю» против пандемического гриппа [33].

В ГНЦВБ «Вектор» разработан способ получения живой коревой вакцины в форме таблетки, предусматривающий этапы лиофилизации [40]. Кратко суть предложенных авторами технологических приемов состоит в следующем. В качестве стабилизирующего состава в вирусосодержащую жидкость вводят сахарозу, желатозу и пептон до конечной их концентрации в смеси по 3 мас. % каждого компонента стабилизатора. Состав разливают в лотки по 1 л (толщина слоя жидкости 0,5 см) и замораживают при температуре минус 60 °С в течение 18 часов. Продукт лиофильно высушивают в течение 48 часов в стерильных условиях. После лиофилизации сухой вирусосодержащий материал измельчают, смешивают с лактозой и стеаратом кальция и таблетуют.

В этом же институте разработан способ получения живой коревой вакцины в форме капсул [38]. Технологические приемы были следующие. Индивидуальные вирусные сливы с биологической активностью не ниже $5,0 \lg \text{TЦД}_{50}/0,5 \text{ мл}$ объединяют и освобождают фильтрованием от клеточного детрита. В полученную суспензию добавляют стерильные растворы 50%-ного сорбита, 50%-ной сахарозы, 25%-ной желатозы (мол. масса 3000) и 25%-ного пептона до конечной концентрации 0,8–1,2, 2,5–3,5, 2,5–3,5, 2,5–3,5 мас. % каждого компонента соответственно. Состав разливают в лотки по 1 л (толщина слоя жидкости 0,5 см) и замораживают при температуре минус 60 °С в течение 18 часов. Продукт лиофильно высушивают в течение 48 часов в стерильных условиях. Высушенный вирусосодержащий материал измельчают. Полученной массой заполняют капсулы. Авторы утверждают, что состав стабилизатора обеспечивает оптимальные условия для сохранения активности вируса кори в процессе лиофильной сушки с получением однородной матрицы с максимальной температурой стеклования и сохранение титра вируса кори в процессе его хранения и использования в препаративной форме.

Известен способ получения ассоциированной паротитно-коревой вакцины [20]. В качестве стабилизаторов активных компонентов вакцинных штаммов вируса эпидемического паротита штамма Л-3 и вируса кори штамма Л-16 используют АС-18 с желатином или сорбит с желатозой. Также авторы анонсируют, что в качестве одного из стабилизаторов вместо желатина или желатозы может быть использован полиглюкин или поли-Н-

винилпирролидон, который применяют с молекулярной массой не менее 12 кДа с целью стандартизации препаратов. Жидкую паротитно-коревую вакцину разливают в ампулы или флаконы с последующим замораживанием и лиофилизацией. Заморозку препарата осуществляют от минус 30 до минус 55 °С в течение 3–6 ч. Затем вакцину лиофилизируют при температуре от минус 17 до минус 28 °С в течение 24–60 ч с последующим нагревом до температуры от 22 до 28 °С в течение 8–14 ч.

При разработке способа получения живой культуральной вакцины против вируса гриппа в качестве среды высушивания используют или пролин, глицин, лактозу, глютаминовокислый натрий, сахарозу, желатин в конечной концентрации 1,5–5, 1,55, 1,5–10, 1,5–5, 5–30 и 1–10 мас. % соответственно, или сахарозу, желатозу и пептон из сои в конечной концентрации 1–8, 1–8 и 1–8 мас. % соответственно, или сорбит и желатозу в конечной концентрации 3–8 и 3–8 мас. % соответственно. Полученную жидкую форму вакцины разливают в ампулы по 0,5–0,6 мл в каждую и замораживают при температуре не выше минус 38 °С в течение 18–28 ч. Продукт лиофильно высушивают в течение 48 ч в стерильных условиях. После окончания сушки ампулы заполняют инертным газом (аргоном) и запаивают [35].

В качестве среды высушивания при разработке способа получения живой гриппозной вакцины на основе штамма вируса гриппа А(Новошахтинск)3/86 (Н1N1) использовали желатиноль и Д-сорбит из расчета по 2,5 мас. % каждого, препарат в ампулах замораживали до минус 40 °С и лиофилизировали [24].

В ГНЦВБ «Вектор» при разработке и использовании препаратов растительного происхождения в составе среды высушивания гриппозных культуральных вакцин анонсировано возможное повышение безопасности препаратов [25, 26, 39]. Показана эффективность применения 10% сахарозы и 5% полученного с использованием бромелайна гидролизата соевой муки в качестве стабилизирующей добавки. Преимущество применения данной защитной среды выявлено в сравнении со следующими: 10% сахарозы, а также 10% сахарозы и 1,2% желатина. Лيوфилизацию проводили по следующим технологическим приемам. Вирусосодержащую жидкость холодадаптированного реассортантного вируса гриппа А/17/утка/Потсдам/86/92 (Н5N2) в объеме 1 мл смешивали с 4 мл одного из трех стабилизаторов. Полученный материал разливали в ампулы по 0,5 мл. Ампулы с материалом замораживали при минус 79 °С в течение 10–12 ч. После установления вакуума материал высушивали в течение 10–12 ч при температуре

минус 50 °С. Затем ампулы с высушенным материалом заполняли инертным газом (аргоном) и запаивали. Остаточная влажность лиофилизированных образцов составляла 1,0–3,0%. Было выявлено, что снижение титра у образцов с предложенным стабилизатором было меньше на 50–70%.

Имеются данные о способе получения живой культуральной аттенуированной вакцины для профилактики ветряной оспы [21]. Основной задачей изобретения являлось увеличение урожая вируса *Varicella zoster* на 0,75–1,5 lg инфекционных доз выше путем индивидуальных сборов с инфицированных диплоидных клеток ЛЭЧ-3 с использованием тринатрийцитрата, чем в аналогичных культуральных моделях при использовании в качестве диспергента трипсина. Между тем в описании изобретения достаточно подробно рассмотрены вопросы лиофилизации, позволяющие получать готовую лекарственную форму вакцины для профилактики ветряной оспы. Вакцина производится во флаконах под вакуумом вместимостью 2 мл в количестве 0,5 мл, в качестве среды высушивания применяют смесь 0,100 мл раствора ЛС-18 и 0,025 мл 10% раствора желатина. Основные технологические приемы сублимационного высушивания следующие. Кассеты с замороженной до минус 70 °С вакциной ставят на предварительно охлажденные до температуры 0...2 °С полки сублиматора и выдерживают в течение 2 часов. Далее полки охлаждают до минус 52...55 °С и выдерживают не менее 8 часов, после чего камеру сублиматора вакуумируют до давления 75–80 мбар. При достижении данного значения давления температуру полок доводят до минус 20 °С за 5 часов, которую поддерживают в течение последующих 45 часов. Затем температуру полок доводят в течение 1 часа до минус 15 °С и выдерживают 12 часов. Температура материала в течение этого периода составляет от минус 40 °С до минус 32 °С. Далее температуру полок повышают со скоростью 5 °С/час до температуры полок 25...27 °С. Затем этап досушивания. При достижении данной температуры материалом ее поддерживают 15–18 часов.

Исследованиями Collier L.H., посвященными разработке стабильной вакцины против оспы (вирусный материал получен из лимфы теленка), декларированы следующие результаты [50]. Использование в качестве сред высушивания 5% пептона, 1% пептона, 5% белка бычьей плазмы (fract V), 1% белка бычьей плазмы (fract V), 10% нормальной лошадиной сыворотки, 1% декстрана выявило предпочтительность 5% пептона. При сравнении выживаемости вирусного материала, загерме-

тизированного в ампулах в среде азота и под вакуумом, показана предпочтительность последнего.

Аналогичные результаты были получены Nekker A.C. & Smith L. при сравнительном анализе различных сред высушивания для лиофилизации вирусного материала, произведенного в монослоях первичных клеток почек кролика. Также авторы констатировали отсутствие влияния на выживаемость вирусного материала, загерметизированного в ампулах в среде азота и под вакуумом [55].

Предложен способ получения живой рекомбинантной вакцины «Ревакс В» для профилактики гепатита В и натуральной оспы для накожного применения, при котором в вирус осповакцины ГКВ N2131 в титре $(3-5) \times 10^8$ ООЕ/мл вносят 5–10 мас.% пептона, после чего полученную вакцину разливают в ампулы, лиофильно высушивают и запаивают под вакуумом или азотом [28].

Известны живая рекомбинантная вакцина «Ревакс-ВТ» гепатита В на основе вируса осповакцины для перорального применения и способ ее получения [29]. Согласно этому способу, вирусосодержащий материал лиофильно высушивают с 20% лактозы и далее проводят операции по изготовлению таблетки.

В патенте РФ 2242246 описаны таблетированная живая рекомбинантная бивакцина «Ревакс ВКТ» против натуральной оспы и гепатита В и способ ее получения [42]. Среди недостатков аналогов авторы выделяли: для живой рекомбинантной вакцины для профилактики гепатита В и натуральной оспы для накожного применения (патент РФ 2073524) — использование в качестве стабилизирующей добавки только пептона, что недостаточно обеспечивает сохранение активности вирусного материала в процессе его лиофилизации; для таблетированной живой рекомбинантной бивакцины против натуральной оспы и гепатита В (патент РФ 2076735) — использование в качестве стабилизирующей добавки только лактозы, что также недостаточно обеспечивает сохранение активности вирусного материала в процессе его лиофилизации. Указанные недостатки устранены использованием в качестве стабилизирующих добавок при лиофильном высушивании комбинации пептона, сахарозы и желатозы в конечной их концентрации в смеси, мас. %: 2,0–4,0, 2,0–3,0, 1,0–3,0 соответственно или мочевины, пептона, сахарозы и желатозы в конечной их концентрации в смеси (мас. %): 1,0–2,0, 2,0–4,0, 2,0–3,0, 1,0–3,0 соответственно. Аналогичные составы сред высушивания описаны в патенте РФ 2302259, посвященном созданию набора таблетированной живой

рекомбинантной оральной бивакцины против натуральной оспы и гепатита В [41].

Имеются данные о способе получения вакцины оспенной эмбриональной живой таблетированной ТЭОВак [43]. В описании изобретения рассмотрены вопросы лиофилизации, позволяющие получать готовую лекарственную форму вакцины для профилактики натуральной оспы. Основные технологические приемы сублимационного высушивания следующие. Жидкий вирусодержащий материал с 15% лактозы разливают по стерильным кюветам с высотой слоя 10–12 мм, замораживают при температуре не выше минус 30 °С в течение не менее 4 часов. Процесс сушки протекает при следующих технологических параметрах: температура конденсатора-вымораживателя — от минус 55 до минус 65 °С, температура греющих полок — не выше 30 °С, остаточное давление в сушильной установке — не менее 20 Па, время досушивания материала при достижении температуры 23–27 °С — до 12–14 ч, общая продолжительность сушки — до 30 часов. Из полученного лиофилизата изготавливают таблетку.

Немецкими учеными для повышения показателя «выживаемость» живой вакцины против желтой лихорадки 17D после ее сублимационного высушивания апробированы шесть вариантов сред высушивания: А — 2% сорбитола, 4% лактозы, 0,01 М гистидина, 0,01 М аланина, 0,1 г/л хлористого кальция, 0,076 г/л сульфата магния; В — 2% сорбитола, 4% инозитола; С — 10% сахарозы; D — 15% трегалозы; Е — 15% трегалозы, 0,01 М гистидина, 0,01 М аланина, 0,1 г/л хлористого кальция, 0,076 г/л сульфата магния; F — 10% сахарозы, 5% лактальбумина, 0,1 г/л хлористого кальция, 0,076 г/л сульфата магния; выявлена предпочтительность вариантов В, С и F [48].

При изучении основных биологических свойств живой сибиреязвенной антибиотикоустойчивой вакцины СТИ-ПР в процессе длительного хранения был сделан вывод, что состав среды для лиофильного высушивания существенно влияет на продолжительность сохранения жизнеспособности спор вакцины. Оптимальными консервирующими свойствами для вакцины СТИ-ПР обладают тиомочевинная и сахарозо-желатиновая среды высушивания, на которых через 8 лет хранения регистрируется до 50–58% жизнеспособных спор от исходного уровня. Кроме вышеназванных сред высушивания, исследовались серии вакцины, лиофилизированные с глутамином и в дистиллированной воде [3]. Надо отметить, что живую сибиреязвенную вакцину в форме лиофилизата производят только в России.

Имеются данные о способе получения сухой комбинированной сибиреязвенной вакцины [22]. Авторы утверждают, что использованные приемы лиофилизации позволяют увеличить срок хранения вакцины (до 4 лет) и расширить температурный режим хранения (до плюс 25 °С в течение месяца) при доставке вакцины потребителю. Сухая комбинированная сибиреязвенная вакцина состоит из следующих компонентов: сорбированного протективного антигена, получаемого из *Bacillus anthracis* штамма 55/5; спор *B. anthracis* штамма СТИ-1; сахарозы; геля гидроокиси алюминия. Одна прививочная доза вакцины (в объеме 0,5 см³) содержит (40...60) млн спор штамма СТИ-1, (30...40) ИД₅₀ ПА, не более 0,2 мг общего азота, не более 2,5 мг окиси алюминия, не более 0,0005% формальдегида и (18...22) мг сахарозы. Способ приготовления сухой комбинированной сибиреязвенной вакцины описан ниже. Споровую суспензию *B. anthracis* штамма СТИ-1 разводят стерильным физиологическим раствором до концентрации 0,8...1,2 млрд спор/см³. Полученную суспензию смешивают со стерильным 40%-ным раствором сахарозы в объемных соотношениях 1:1 и перемешивают в течение 15...20 мин. Концентрат сорбированного ПА разводят стерильным физиологическим раствором до содержания 400 ИД₅₀/см³. Равные объемы приготовленных компонентов объединяют и тщательно перемешивают. В приготовленном жидком полуфабрикате комбинированной вакцины должно содержаться 200...300 млн спор/см³ и 180...220 ИД₅₀/см³ ПА. Приготовленный полуфабрикат вакцины разливают по 2 см³ (10 прививочных доз) в ампулы вместимостью 6 см³ или флаконы объемом 10 см³. Леофильное высушивание вакцины осуществляют в камерных сушильных установках, обеспечивающих нижеуказанный режим: температура замораживания суспензии — минус 35...40 °С; время выдерживания — 3...4 ч; разрежение в сублиматоре — 20...25 Па; досушивание материала — при температуре 30...32 °С в течение 10...12 ч.

Известен способ получения препарата на основе вакцинного штамма чумного микроба [44]. Необходимость предложенных в изобретении решений вызвана, по мнению авторов, рядом недостатков способа получения коммерческой вакцины чумной живой сухой на основе вакцинного штамма EV, применяемого в 48 ЦНИИ Минобороны России, к которым относятся:

- применение в качестве компонента защитной среды высушивания декстрина, который вследствие процессов коагуляции и дальнейшей седиментации, спровоцированной воздействием высокой температуры при стерилизации автоклавированием,

приводит к искусственному увеличению оптической плотности по сравнению с исходной. Это в дальнейшем способствует неадекватности оценки действительной концентрации, возрастанию оптической концентрации микробных клеток непосредственно в вакцинном препарате. Вышеуказанные обстоятельства ведут к нежелательному снижению одного из важнейших показателей качества вакцины чумной живой — процента живых микробных клеток;

- использование традиционного режима высушивания вакцинной взвеси с высокой гибелью микробов в условиях лиофильного стресса.

Регламентный состав среды высушивания был следующий: лактоза, г·л⁻¹ — 300; декстрин, г·л⁻¹ — 30; тиомочевина, г·л⁻¹ — 30; аскорбиновая кислота, г·л⁻¹ — 30; вода дистиллированная, л — до расчетного объема. Лиофилизация препарата осуществлялась в соответствии со следующими технологическими параметрами: температура конденсатора — минус 50...70 °С; температура замораживания материала — минус 30 °С; разрежение в сушильной камере — не более 300 мкм рт. ст.; скорость сушки — 2 °С·ч⁻¹; время досушивания — 10 ч.

В ходе исследований авторами получены следующие результаты: замена декстрина на полиглюкин позволила увеличить количество живых микробных клеток на 10%; максимум выживаемости чумного микроба в процессе замораживания наблюдается при замораживании вакцины при температуре, равной 40 °С; увеличение скорости сушки с 2 °С·ч⁻¹ до 3 °С·ч⁻¹ и сокращение времени досушивания препарата с 10 до 6 часов не оказывают влияния на нормируемые свойства вакцины.

Разработанные методические приемы процесса лиофилизации препарата, расфасованного по 2 мл во флаконы, были следующие. За 3 ч до загрузки охлаждают полки камеры сублимационной сушильной установки до температуры минус 40 °С, конденсатор — до температуры минус 60 °С. Кюветы с флаконами устанавливают на полки сублиматора и проводят замораживание вакцинной взвеси до температуры минус 40 °С с последующей выдержкой при данной температуре в течение 2 ч. Создают разрежение в установке не более 100 мкм рт. ст. Через 1 ч после создания заданной величины разрежения включают подогрев полок и проводят постепенное повышение температуры до 0 °С со скоростью сушки в этот период 3 °С·ч⁻¹. При достижении температуры в материале 0 °С за 6 ч доводят ее до температуры 25...30 °С (скорость сушки 5...6 °С·ч⁻¹). Досушивание проводят при этой температуре в течение 6 ч.

Значимую информацию представляет цикл работ специалистов Ставропольского НИПЧИ по изучению влияния концентрации вакцинной суспензии *Y. pestis* EV, объема препарата в первичной упаковке и температуры культивирования чумного микроба на их жизнеспособность при лиофилизации. В начале 1990-х годов методами электронной микроскопии выявлена корреляция между числом поврежденных клеток в вакцине по мере увеличения общей концентрации микробов в суспензии и от ее объема (1 и 2 мл) в ампуле [5]. Исследованиями Будьки Д.А. с соавт., посвященными стабилизации свойств маточной культуры эталонного вакцинного штамма *Y. pestis* EV, показано, что уменьшение объема вакцинной суспензии в ампуле до 1 мл и снижение концентрации микробных клеток улучшало такие показатели, как термостабильность и повреждаемость [10]. Изучение качественных характеристик образцов вакцины чумной живой сухой подтвердило полученные данные. На образцах препаратов с общей концентрацией микробов в суспензии: 50, 75, 100 млрд/мл выявлено, что по мере увеличения концентрации также увеличивается число поврежденных клеток. Аналогичная ситуация наблюдалась в препаратах у суспензий с концентрацией 50 и 75 млрд/мл в зависимости от ее объема (1 и 2 мл) в ампуле. При уменьшении объема уменьшалось число поврежденных клеток [16, 18]. Дальнейшие исследования позволили создать готовую лекарственную форму вакцины чумной живой сухой, отвечающую требованиям нормативных документов со сниженным количеством (20–50) человеко-доз в ампуле по 1 мл, соответственно с уменьшенной концентрацией микробных клеток — 1×10^{10} ... 4×10^{10} в 1 мл (предыдущая форма вакцины содержала 80–430 человеко-доз в ампуле по 2 мл с концентрацией микробных клеток — 5×10^{10} ... 10×10^{10} в 1 мл). Доказана возможность уменьшения времени лиофилизации вакцины с 28 до 18 часов за счет снижения количества препарата в ампуле с 2 до 1 мл.

Продолжением этих работ было изучение влияния температуры культивирования микроорганизмов на их жизнеспособность при лиофилизации. Обнаружено, что экспериментальные серии чумной вакцины, полученные при температуре выращивания *Y. pestis* EV 21 ± 1 °С, проявили большую устойчивость к процессу замораживания-высушивания, чем контрольные. Расчет количества подкожных доз показал, что в опытном препарате их содержится 105, а в контрольном — 80 (в качестве контроля использовалась биомасса *Y. pestis*, выращенная при температуре 27 ± 1 °С). Также ими проведены исследования по влиянию концентрации микро-

организмов и объема продукта в первичной упаковке. Были приготовлены серии вакцины, отличающиеся по концентрации вакцинной суспензии (90 и 20 млрд./мл) и объему вакцины в ампуле (2 и 1 мл соответственно). Воздействие стрессового температурного фактора (хранение при $37\pm 1^\circ\text{C}$) на исследуемые образцы продемонстрировало, что серии, полученные при температуре культивирования $21\pm 1^\circ\text{C}$, в целом обнаруживали большую резистентность к экстремальному воздействию, причем наиболее устойчивыми оказались образцы с меньшей концентрацией и объемом суспензии в ампуле, имеющие также меньшие показатели потери в массе при высушивании (1,7% против 2,4% у контрольных) [1, 6–8]. При изучении морфометрических показателей *Y. pestis* EV, выращенных при температурах 21 ± 1 и $27\pm 1^\circ\text{C}$, выявлено уменьшение размеров клеток, выращенных при $21\pm 1^\circ\text{C}$, что, по мнению авторов, вызвано изменением физиологической активности. Также высказано предположение о том, что в мембранных структурах (цитоплазматическая мембрана и мембрана клеточной стенки) липидные слои представлены в большей степени ненасыщенными жирными кислотами. Это, в свою очередь, делает мембраны менее уязвимыми к таким факторам, как замораживание при низких температурах с последующей лиофилизацией [9]. Также авторы декларируют, что полученные ими данные согласуются с результатами других исследователей [4, 15].

При математическом моделировании процесса сублимационного высушивания вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, являющегося промежуточным этапом приготовления таблетированной формы чумной живой вакцины, было исследовано влияние технологических (продолжительность замораживания, разрежение в сублимационной камере, продолжительность и температура досушивания) и биологических факторов (содержание клеток в вакцинной взвеси, концентрация в ней жизнеспособных клеток и ее кислотность) на сохранение жизнеспособной биомассы в культуре после сублимационного высушивания. Факторный анализ выявил определяющую роль следующих параметров: общее содержание клеток в вакцинной взвеси, концентрация жизнеспособных клеток в вакцинной взвеси, продолжительность и температура досушивания [46]. Авторы констатировали, что полученные эмпирическим путем данные коррелируют с результатами экспериментов.

Специалистами Республики Казахстан разработан аттенуированный штамм бактерии *Fransisella tularensis mediaasiatica* 240, перспективный, по мнению авторов, для создания туляремийной вакцины. Бактериальную

массу с концентрацией 10 млрд м.к./мл разливали по 1–2 мл в ампулы, замораживали в течение 18 часов и лиофилизировали 48 часов. Полученный препарат обладал остаточной влажностью 3,6%. Следует обратить внимание на то, что после контроля вакцины показатель «термостабильность» составлял 6%. При этом авторы декларируют о соответствии требованиям регламента производства (для российской коммерческой туляремийной вакцины данный показатель составляет величину не менее 50%) [2].

Имеются сведения об экспериментальных разработках вакцин для профилактики диареи, вызываемой энтеротоксигенной кишечной палочкой [59]. При обосновании различных вариантов сред высушивания был аргументирован следующий качественный состав: сахароза и трегалоза — в качестве криопротекторов; фосфаты и соли глутамата — как буферы и стабилизаторы; Natrosol[®], поливинилпирролидон и маннит — в качестве связующих.

Yamamoto S. & Yamamoto T. в обзоре, посвященном историческим аспектам использования и производства противотуберкулезной вакцины на основе *Mycobacterium bovis* штамма Tokyo 172, приводят ряд фактов, касающихся вопросов ее лиофилизации. Ими установлено, что культуры в фазе логарифмического роста обладают более высокой устойчивостью к процессу сублимационной сушки по сравнению с культурами в стационарной фазе. Также показано преимущество применения в качестве среды высушивания глутамата натрия в сравнении с сахарозой и лактозой. Доказано, что при величине остаточной влажности более 3% вакцины быстрее теряют жизнеспособность. Выявлено, что препараты, загерметизированные под вакуумом или в среде азота, лучше сохраняют жизнеспособность в сравнении с загерметизированными в среде атмосферного воздуха [70].

Для повышения жизнеспособности лиофилизированной вакцины БЦЖ (штамм *Mycobacterium bovis* BCG 1173P2) специалистами Иранского института Пастера экспериментально обоснован следующий состав среды высушивания, %: глутамат натрия — 1,0, глюкоза — 0,5, декстран — 2%, лактоза — 1% [57]. Другими исследователями для этих целей обосновано использование маннитола, трегалозы, сахарозы и глутамата натрия [58]. Индийскими учеными при оценке 3 сред высушивания: трегалоза, трегалоза и желатин, лактоза выявлено преимущество последней [61].

Анализируя сведения научной и патентной литературы по технологическим особенностям лиофилизации живых вакцин, можно сделать вывод о существенном

разнообразии как температурно-временных параметров процесса их лиофилизации, так и качественно-количественного состава защитных сред высушивания.

В данном обзоре мы посчитали целесообразным дать сведения об экспериментальных работах по внедрению технологии вакуумной сушки живых вакцин, которые исследователи называют модификацией технологии сублимационного высушивания [62–64]. На наш взгляд, трактовать данный вид сушки модификацией технологии сублимационного высушивания не совсем правильно в силу того, что обезвоживание осуществляется при давлении препарата выше давления тройной точки воды, то есть без его замораживания. Тем не менее мы посчитали уместным раскрыть особенности технологических приемов получения живых вакцин при данном методе обезвоживания.

Исследованиями Ohtake S. et al. показано, что наибольшая выживаемость после лиофилизации выявлена у вакцинного штамма *F. tularensis* LVS, полученного при окончании процесса его культивирования при переходе от экспоненциальной к стационарной фазе роста. Из достаточно широкого спектра стабилизаторов, применяемых при сублимационной сушке, выявлена предпочтительность следующей комбинации компонентов — трегалоза, желатин и плазмозамещающий препарат Pluronic F68 [63].

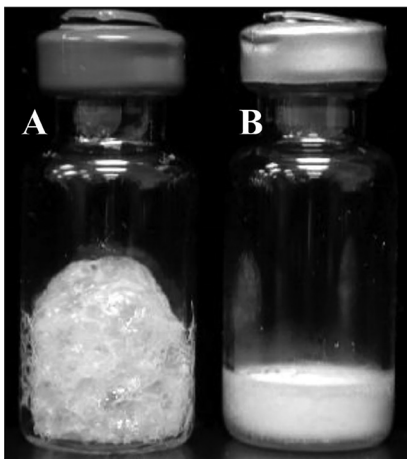


Рис. 1. Внешний вид сухих препаратов: А — полученного вакуумной сушкой, В — полученного традиционной лиофилизацией

Этим же коллективом авторов при разработке технологических приемов получения живой аттенуированной вакцины против сыпного тифа также выявлено, что наибольшая выживаемость после лиофилизации достоверно присутствует у вакцинного штамма *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a, полученного при окончании процесса его культивирования при переходе от экспоненциальной

к стационарной фазе роста. Технологические аспекты сушки были следующие. Бактериальные рецептуры, содержащие различные комбинации стабилизаторов, были розлиты по 1 мл в флакон вместимостью 10 мл, подвергнуты обезвоживанию в сублимационной сушильной установке при остаточном давлении до 100 мТорр в течение 40 часов при температуре 15 °С и 20 часов при 20 °С. Далее флаконы были загерметизированы под вакуумом с аргонном. Остаточная влажность во всех препаратах, использованных в исследованиях, составляла 2–4%. Также испытуемые образцы были высушены традиционной лиофилизацией.

На рисунке 1 показан внешний вид сухих препаратов. В результате проведенных исследований обоснована предпочтительность использования в качестве стабилизаторов комбинации трегалозы, метионина и желатина. Зафиксирована большая жизнеспособность микроорганизмов и иммуногенность у образцов, полученных вакуумной сушкой [62]. Аналогичные результаты были получены при разработке живой, аттенуированной интраназальной вакцины против респираторно-синцитиального вируса и вируса парагриппа-3 у серопозитивных детей Medi 534 [47].

Литература

1. Абзаева Н.В. Повышение жизнеспособности *Yersinia pestis* EV в биомассе вакцины: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ставрополь, 2010. — 19 с.
2. Айкимбаев А.М., Чимиров О.Б., Лухнова Л.Ю., Темралиева Г.А., Куница Т.Н. Штамм бактерии *Fransisella tularensis* mediaasiatica 240, аттенуированный, используемый для приготовления вакцины // Патент Республики Казахстан 12742. С12N1/20. 2003.
3. Аксенова Л.Ю. Изучение основных биологических свойств живой сибиреязвенной антибиотикоустойчивой вакцины СТИ-ПР в процессе длительного хранения: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Ростов-на-Дону, 2005. — 24 с.
4. Алутин И.М., Домарадский И.В., Суичмезова А.В. Изучение динамики размножения некоторых видов микроорганизмов с помощью полтермостата // Проблемы особо опасных инфекций. — 1973. — № 1(29). — С. 182–189.
5. Бондаренко А.И., Тинкер А.И. Разработка электронно-микроскопического теста количественного определения поврежденных бактериальных клеток. — Деп. ВИНТИ 07.05.1991. — № 3228-В91. — Ставрополь, 2000. — 16 с.
6. Будыка Д.А. Экспериментальное обоснование снижения общей концентрации микробов и объема суспензии в контейнере в технологии живой чумной вакцины EB // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2002. — № 3–4. — С. 42–45.

7. Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Ракитина Е.Л., Иванова Г.Ф., Фисун А.А. Биотехнология стабилизации живых микроорганизмов в биомассе и в препарате чумной вакцины // Инфекция и иммунитет. — 2016. — Т. 6. — № 1. — С. 87–92.
8. Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Гостищева С.Е., Фисун А.А., Ляпустина Л.В. Сравнительный анализ экспериментальных серий вакцины чумной живой по показателям жизнеспособности и термостабильности // Проблемы особо опасных инфекций. — 2009. — № 4(102). — С. 68–71.
9. Будыка Д.А., Бондаренко А.И., Фисун А.А., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Гостищева С.Е., Руднев С.М. Качественные показатели микробных клеток штамма *Yersinia pestis* EV в зависимости от их морфологических особенностей при разных температурных условиях биотехнологии приготовления препарата вакцины чумной // Проблемы особо опасных инфекций. — 2012. — Вып. 114. — С. 33–35.
10. Будыка Д.А., Тинкер А.И., Иванова Г.Ф., Голушаня К.С., Бондаренко А.И. Стабилизация свойств маточной культуры эталонного вакцинного штамма EV в биотехнологии чумной живой вакцины. — Деп. в ВИНТИ 18.07.00, № 1987-B00. — Ставрополь, 2000. — 12 с.
11. Будыка Д.А. Научно-методические основы совершенствования живой чумной вакцины: дис. ... д-ра мед. наук — Ставрополь, 2002. — 279 с.
12. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание (Том III). — М.: ФЭМБ. 2015. — 1294 с.
13. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных инфекций. — 2016. — Вып. 3. — С. 5–12.
14. Гусаров Д.А. Лиофилизация биофармацевтических белков (миниобзор) // Биофармацевтический журнал — 2010. — Том. 2(5). — С. 3–7.
15. Еременко Ю.Д., Бывалов А.А., Пименов Е.В. Особенности жирно-кислотного состава клеток *Yersinia pseudotuberculosis*, выращенных на плотной питательной среде при различных температурах // Проблемы особо опасных инфекций. — 2005. — Вып. 89. — С. 41–43.
16. Ефременко А.А. Оптимизация параметров вакцинной суспензии в биотехнологии производства вакцины чумной живой сухой. — Деп. в ВИНТИ 28.03.03, № 734-B005. — Ставрополь, 2000. — 7 с.
17. Ефременко А.А. Разработка биотехнологии вакцины чумной живой сухой со сниженным количеством человека-доз в производственной упаковке (ампуле): дис. ... канд. мед. наук. — Ставрополь, 2005. — 124 с.
18. Ефременко А.А. Разработка биотехнологии вакцины чумной живой сухой со сниженным количеством человека-доз в производственной упаковке (ампуле): автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Ставрополь, 2005. — 24 с.
19. Жученко М.А., Пашкова М.А., Потапенко О.В. Лиофилизация препаратов в двухкамерных шприцах // Биотехнология. — 2015. — № 4. — С. 79–84.
20. Зайцев И.Э., Колышкин В.М., Сидоренко Е.С., Попов В.Ф., Юминова Н.В., Красильников И.В., Дорофеева Л.В. Способ получения ассоциированной паротитно-коревой вакцины // Патент РФ 2158134. А61К 39/165. 2000.
21. Зверев В.В., Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Осокина О.В. Способ получения живой культуральной аттенуированной вакцины // Патент РФ 2637093. А61К 39/25. 2017.
22. Кожухов В.В., Пименов Е.В., Сероглазов В.В., Юдников В.А., Меновицков В.А. Способ получения сухой комбинированной сибиреязвенной вакцины // Патент РФ 2181294. А61К 39/07. 2002.
23. Кочкалова Н.Н., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Лобовикова О.А., Савицкая Л.В., Бадарин С.А., Генералов С.В., Костылева Н.И., Шарпова Н.А., Иванов Ю.В. Оптимизация формы выпуска и потребительской тары иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. — 2012. — № 5(87), Часть 1. — С. 236–238.
24. Крашенюк А.И. Способ получения живой гриппозной вакцины // Патент РФ 2033182. А61К 39/145. 1995.
25. Мазуркова Н.А. Разработка и использование препаратов растительного происхождения в технологиях создания гриппозных вакцин: автореф. дис. ... докт. мед. наук. — Кольцово, 2005. — 48 с.
26. Мазуркова Н.А., Скарнович М.О., Трошкова Г.П., Шишкина Л.Н. Оптимизация процесса сублимационного высушивания культуральных холодоадаптированных вакцинных образцов вируса гриппа А/Н5N2 // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2011. — № 5. — С. 98–100.
27. Могилюк В. Аспекты лиофилизационной сушки водных растворов // Фармацевтическая отрасль. — 2014. — № 5(46). — С. 46–53.
28. Муратов П.Ю., Беляев А.С., Дмитриев И.П., Нетесов С.В., Рукавишников М.Ю. Живая рекомбинантная вакцина для профилактики гепатита В и натуральной оспы для накожного применения и способ ее получения // Патент РФ 2073524. А61К 39/29. 1997.
29. Муратов П.Ю., Сандахчиев Л.С., Дмитриев И.П., Беляев А.С., Бектемиров Т.А., Перекрест В.В., Григорьева Л.В., Шалунова Н.В., Подкуйко В.Н., Дыканов Г.А., Дорохина Т.В., Евстигнеев О.В., Михайлов В.В., Краснянский В.П., Колосков А.В., Махлай А.А. Живая рекомбинантная вакцина гепатита В на основе вируса осповакцины для перорального применения и способ ее получения // Патент РФ 2076735. А61К39. 1997.
30. Нежута А.А. Научное обоснование и методика разработки и совершенствования промышленной технологии

- сублимационного высушивания биопрепаратов: дис. ... д-ра биол. наук. — Целково, 2003. — 243 с.
31. Нежута А.А., Сербис Е.С. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов // Биотехнология. — 2001. — № 6. — С. 59–67.
 32. Нежута А.А., Токарник Э.Ф., Самуйленко А.Я. Теоретические и практические основы технологии сублимационного высушивания биопрепаратов. — Курск: Изд-во КГСХА, 2002. — 239 с.
 33. Нечаева Е.А., Радаева И.Ф., Сенькина Т.Ю., Герасименко Н.Б., Богрянцева М.П., Костылева Р.Н., Жилина Н.В., Свириденко Н.М., Зубарева К.Э., Вараксин Н.А., Рябичева Т.Г., Киселева И.В., Ларионова Н.В., Руденко Р.Г. Разработка опытно-промышленной технологии производства живой культуральной вакцины против пандемического гриппа // Биотехнология. — 2013. — № 6. — С. 22–34.
 34. Нечаева Е.А., Сенькина Т.Ю., Радаева И.Ф., Богрянцева М.П., Нечаев Ю.С., Думченко Н.Б., Руденко Л.Г. Разработка технологии производства живой культуральной тривалентной вакцины против сезонного гриппа // Приоритетные направления развития науки и образования. — 2016. — № 1(8). — С. 85–91.
 35. Нечаева Е.А., Сенькина Т.Ю., Радаева И.Ф., Вараксин Н.А., Рябичева Т.Г., Жилина Н.В., Дроздов И.Г. Способ получения живой культуральной вакцины против вируса гриппа // Патент РФ 2420314. А61К 39/145. 2011.
 36. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. — 2009. — № 4(12). — С. 99–118.
 37. Сандахчиев Л.С., Нечаева Е.А., Вараксин Н.А., Рябичева Т.Г., Колокольцова Т.Д., Вилесов А.Д., Станкевич Р.П., Исидоров Р.В. Способ получения микрокапсулированной формы коревой вакцины для перорального применения // Патент РФ 2210361. А61К 9/50. 2003.
 38. Сандахчиев Л.С., Нечаева Е.А., Вараксин Н.А., Рябичева Т.Г., Колокольцова Т.Д. Способ получения живой коревой вакцины // Патент 2140288. А61К39/165. 1999.
 39. Сандахчиев Л.С., Нечаева Е.А., Вараксин Н.А., Рябичева Т.Г., Мазуркова Н.А., Гендон Ю.Э., Маркушин С.Г., Аكوпова И.И., Коптяева И.Б. Способ получения живой культуральной вакцины против вируса гриппа // Патент РФ 2330885. С12N7/00. 2008.
 40. Сандахчиев Л.С., Попов В.Ф., Махлай А.А., Михайлов В.В., Подкуйко В.Н., Дорохина Т.В., Нечаева Е.А., Шалаев Е.Ю., Вараксин Н.А., Рябичева Т.Г., Колокольцова Т.Д. Способ получения живой коревой вакцины // Патент РФ 2123331. А61К9/20. 1998.
 41. Сергеев А.Н., Плясунов И.В., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Генералов В.М., Сергеев А.А., Шишкина Л.Н., Петрищенко В.А., Евтин Н.К., Мистюрин Ю.Н., Скарнович М.О., Мельников С.А., Подкуйко В.Н. Набор таблетированной живой рекомбинантной оральной бивакцины против натуральной оспы и гепатита В и способ вакцинации с использованием указанного набора // Патент РФ 2302259. А61К 39/285. 2007.
 42. Сергеев А.Н., Сандахчиев Л.С., Петрищенко В.А., Сергеев А.А., Пьянков О.В., Евтин Н.К., Нетесов С.В., Шишкина Л.Н., Ведерников Б.Ф., Генералов В.М., Шишкин А.В., Сафатов А.С., Кочнева Г.В., Михеев М.В. Таблетированная живая рекомбинантная бивакцина «Ревакс ВКТ» против натуральной оспы и гепатита В и способ ее получения // Патент РФ 2242246. А61К 39/12. 2004.
 43. Терентьев А.И., Подкуйко В.Н., Пастушенко С.Б., Шмалько И.В., Максимов В.А., Хамитов Р.А., Жуков В.А. Способ получения вакцины оспенной эмбриональной живой таблетированной // Патент РФ 2220949. А61К 39/285. 2007.
 44. Тетерин В.В., Ежов А.В., Бирюков В.В., Мохов Д.А., Багин С.В., Хонин А.Э., Логвинов С.В. Способ получения способ получения препарата на основе вакцинного штамма чумного микроба // Патент РФ 2510825. А61К 39/02. 2014.
 45. Трифонов В.Д., Юденко С.В., Белов А.В. Живая культуральная коревая вакцина // Патент РФ 2144369. А61К 35/76. 2000.
 46. Швецов С.А., Черкасов Н.А., Ежов А.В., Багин С.В., Тетерин В.В., Мохов Д.А. Математическое моделирование процесса приготовления таблетированной формы чумной живой вакцины // Биомедицина. — 2011. — № 1. — С. 64–71.
 47. Abdul-Fattah A.M., Truong-Le V., Yee L., Pan E., Ao Y., Kalonia D.S., Pikal M.J. Drying-induced variations in physicochemical properties of amorphous pharmaceuticals and their impact on stability II: Stability of a vaccine // Pharm. Res. — 2007. — Vol. 24(4). — P. 715–727.
 48. Barne M., Bronnert C. Thermostabilisation du vaccin anti-amaril 17D lyophilize. I. Essai des substances protectrices // Biol. Stand. — 1984. — Vol. 12. — P. 435–442.
 49. Cochran T., Nail S.L. Ice nucleation temperature influences recovery of activity of a model protein after freeze-drying // J. Pharm. Sci. — 2009. — Vol. 98. — P. 3495–3498.
 50. Collier L.H. The development of a stable smallpox vaccine // J. Hyg. (Lond). — 1955. — Vol. 53. — P. 76–101.
 51. Constantino H.R., Pikal M.J. Lyophilization of biopharmaceuticals. — Arlington, VA, USA: AAPS Press, 2004. — 686 p.
 52. Couriel B. Freeze drying: Past, present, and future // PDA J. Pharm. Sci. Technol. — 1980. — Vol. 34. — P. 352–357.
 53. Franks F. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice // Eur. J. Pharm. Biopharm. — 1998. — Vol. 45. — P. 221–229.

54. *Franks F., Auffret T.* Freeze-Drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals. – Cambridge, UK: RSC Publishing, 2007. – 220 p.
55. *Hekker A.C., Smith L.* A stable freeze-dried smallpox, vaccine made in monolayer cultures of primary rabbit, kidney cells // *J. Biol. Stand.* – 1973. – № 1. – P. 21–32.
56. *Heller M.C., Carpenter J.F., Randolph T.W.* Protein formulation and lyophilization cycle design: prevention of damage due to freezeconcentration induced phase separation // *Biotechnol. Bioeng.* – 1999. – Vol. 63. – P. 166–174.
57. *Jahanbakhsh Sefidi F., Kaghazian H., Moradli G.A., Hassanzadeh S.M.* Improvement of thermal stability of BCG vaccine // *Iran Biomed. J.* – 2017. – Vol. 21(6). – P. 406–410.
58. *Jin T.H., Nguyen L., Qu T., Tsao E.* Improved formulation and lyophilization cycle for rBCG vaccine // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29. – P. 4848–4852.
59. *Lal M., Priddy S., Bourgeois L. et al.* Development of a fast-dissolving tablet formulation of a live attenuated enterotoxigenic *E. coli* vaccine candidate // *Vaccine.* – 2013. – Vol. 31(42). – P. 4759–4764.
60. *Michael S.T.* Comparison of product behavior during lyophilization when processed in dual chamber cartridges and tubing vials [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.pharmaedresources.com/brochures/2014PhiladelphiaLyoBrochure.pdf>.
61. *Mohamed D., Elsayed I., Mohamed A.F., Yehia S.A.* Real time stability and viability prediction of the anticancer BCG after lyophilization // *Drug. Dev. Ind. Pharm.* – 2015. – Vol. 41(11). – P. 1769–1776.
62. *Ohtake S., Martin R., Saxena A., Pham B., Chiueh G., Osorio M., Kopecko D., Xu D., Lechuga-Ballesteros D., Truong V.L.* Room temperature stabilization of oral, live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi-vectored vaccines // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29(15). – P. 2761–2771.
63. *Ohtake S., Martin R.A., Saxena A., Lechuga-Ballesteros D., Santiago A.E., Barry E.M., Truong-Le V.* Formulation and stabilization of *Francisella tularensis* live vaccine strain // *J. Pharm. Sci.* – 2011. – Vol. 100(8). – P. 3076–3087.
64. *Ohtake S., Martin R., Yee L., Chen D., Kristensen D.D., Lechuga-Ballesteros D., Truong-Le V.* Heat-stable measles vaccine produced by spray drying // *Vaccine.* – 2010. – Vol. 28(5). – P. 1275–1284.
65. *Pikal M.J., Rambhatla S., Ramot R.* The impact of the freezing stage in lyophilization: Effects of the ice nucleation temperature on process design and product quality // *Am. Pharm. Review.* – 2002. – Vol. 5. – P. 48–53.
66. *Searles J.A., Carpenter J.F., Randolph T.W.* The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf // *J. Pharm. Sci.* – 2001. – Vol. 90. – P. 860–871.
67. *Shackell L.D.* An improved method of desiccation, with some applications to biological problems // *Am. J. Physiol.* – 1909. – Vol. 24. – P. 325–340.
68. *Singh M., Varshney D.* Lyophilized biologics and vaccines: Modality-Based approaches. – New York, Springer, 2015. – 401 p.
69. *Tang X., Pikal M.* Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice // *Pharm. Res.* – 2004. – Vol. 21. – P. 191–200.
70. *Yamamoto S., Yamamoto T.* Historical review of BCG vaccine in Japan // *Jpn. J. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 60. – P. 331–336.
71. *Zimmermann J.* Comparing lyophilization in vials and Dual-Chamber Systems // [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.pharmtech.com/comparing-lyophilization-vial-and-dual-chamber-systems>.

LYOPHILIZATION OF LIVE VACCINES

A.V. KOMISSAROV^{1,2}, D.N. BIBIKOV¹, O.A. VOLOKH¹, S.A. BADARIN¹,
N.V. SINITSYNA¹, N.I. KOSTYLEVA¹, V.G. GERMANCHUK¹, A.K. NIKIFOROV^{1,2}

¹ Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»,

² N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov

A review of Russian and foreign literature on the issues of freeze-drying of live vaccines is presented. The data on the qualitative and quantitative composition of auxiliary substances (drying media) used in the lyophilization of vaccines are discussed. The information about the stages of lyophilization and their features are considered. The impact of the sealing process of the primary packaging directly on the lyophilizer chamber on the quality of the preparations was analyzed. An idea of the excipients used in the freeze-drying is given. On a number of examples the influence of the technological parameters of the lyophilization process on the quality of preparations was showed. The analysis of the literature data allows to take into account the influence of the parameters described in the review when developing the technology for the production of immunobiological preparations for the diagnosis and prevention of infectious diseases.

Keywords: lyophilization, live vaccines, drying media, technological parameters.

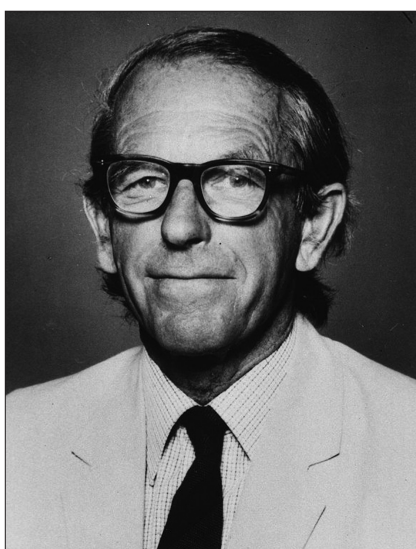
К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ФРЕДЕРИКА СЕНГЕРА – ВЕЛИКОГО ХИМИКА XX СТОЛЕТИЯ

В.С. ВОРОБЬЕВ*

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва

В работе помещены материалы к 100-летию со дня рождения Ф. Сенгера. Журнал уже обращался к анализу жизни и творчества этого ученого [см. 1, 2]. В настоящей статье дается дополнительный комментарий.

Ключевые слова: история науки, молекулярная биология, биографии, Фредерик Сенгер.



В 2018 году исполнилось 100 лет со дня рождения Фредерика Сенгера, английского химика, дважды лауреата Нобелевской премии, автора выдающихся открытий. Наш журнал откликнулся на памятные даты, связанные с жизнью и деятельностью этого ученого, например, с 90-летием [2] или другими событиями [1]. 100-летний юбилей обязывает отреагировать на данный рубеж и дать соответствующие комментарии и оценки. При этом можно будет не останавливаться на частностях, а стремиться к обобщениям и избеганию повторов.

Материалов об этом ученом более чем достаточно в печатной и электронной форме [3, 4, 8, 11, 13, 17]. Особенно следует отметить подробную биографию

Сенгера, написанную его коллегой Дж. Браунли и вышедшую в свет сразу же после его смерти (в 2014 году) [6]. Бесценную информацию представляет и собственное изложение обстоятельств жизни и творчества, сделанное в статье «Последовательности, последовательности и последовательности», опубликованной Сенгером в 1988 году [15] после некоторого периода молчания в связи с уходом на пенсию и вышедшей к его 70-летию, которая по сути является своеобразной автобиографией ученого. Расширяют представления о нем и сравнительно немногочисленные интервью, данные им уже в отставке [5, 7, 10, 12].

Научный вклад Сенгера общеизвестен, можно подробно рассказывать и повторяться о том, как много может сделать один человек в науке. Масштаб его личности огромен, и есть специалисты, которые ставят его в ряд самых великих людей в истории науки и приравнивают его к личностям типа Дарвина, Эйнштейна и др., поскольку уровень сделанного в науке Сенгером можно классифицировать как глобальное деяние порядка открытия нового материка или принципиально нового взгляда на природу вещей. Такие метафоры в молекулярной биологии позволяла себе американская пресса при комментариях открытия Ниренбергом генетического кода в 1961 году, сравнивая его с полетом Гагарина. Это, конечно, осознавал и Сенгер и в молодые годы, и впоследствии в период расцвета своей деятельности, и на закате дней, но в силу своей врожденной скромности спокойно и сдержанно переносил такую славу и приложил максимум возможного к тому, чтобы о нем говорили как можно меньше.

Жизнеописание великого человека всегда составляло сокровенную тайну, к которой требуется особый подход, включая этику, чувство меры и достаточный профессионализм. Сухие факты, жизненные обстоятель-

© 2018 г. Воробьев В.С.

* Автор для переписки:

Воробьев Вадим Сергеевич

к.м.н., член Центрального Правления Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru

ства, способы воспитания и образования и др. дают, как правило, лишь основу для анализа развития личности. А самое главное — нужно определить объединяющую идею, вокруг которой следует сгруппировать итоги многолетнего труда исследователя.

На наш взгляд, многое в творческой судьбе Сенгера было обусловлено фактором воспитания в квакерской обстановке. Здесь на первый план выходят такие черты, как пример отца, личная скромность, пацифизм, высокие жизненные цели, миссионерство и т.д. Сходные особенности поведения были присущи другим английским ученым, выходцам из семей квакеров (Ч. Дарвин, Ф. Гальтон, Дж. Дальтон, А. Эддингтон и др.). В случае Фредерика Сенгера многие указанные черты проявлялись в высшей степени и дали столь впечатляющий результат. Что касается религиозных и гносеологических взглядов Сенгера, то он в молодые годы был терпим к квакерским традициям семьи, затем отошел от них, а позднее больше склонялся к агностицизму [9].

Линия его жизни неброская по своей внешней стороне, но содержательная по фактическим делам. В детстве потерял обоих родителей (умерли от рака). Сенгер мечтал, чтобы пойти по стопам отца, сначала хотел стать медиком, но потом занялся биохимией. Объективно говорил об отсутствии у себя ораторских способностей, а вот задатки исследователя, по его мнению, у него были, и он их полностью реализовал (известно к тому же, что препаративный труд биохимика требует огромной самоотдачи, ему необходимы редкостные черты в виде долготерпения и тонкой ремесленной сноровки и т.д.).

Безусловно, самая яркая страница в его творчестве — это расшифровка строения молекулы инсулина. Хотя эпопея с инсулином в автобиографическом изложении первооткрывателя выглядит буднично и непривлекательно и как бы предопределена цепью одного из другого вытекающих событий, без выпячивания личного вклада и центрированного волевого вектора главного действующего лица [15]. Тем не менее сообщенные от первого лица факты позволяют выстроить последовательность событий.

Возможность продолжить научную работу во время 2-й мировой войны (из-за квакерства), благоприятная атмосфера биохимической лаборатории в Кембридже, наставничество А. Нейбергера и Э.Ч. Чибналла (от последнего он получил инсулиновую тему), посещение лаборатории Тизелиуса в Швеции в трудные послевоенные годы, сотрудничество с Г. Туппи (Австрия) и Э.О.П. Томпсоном (Австралия) и т.д. — все это сработало на

то, чтобы за более чем 10-летний период (1943—1955 гг.) была раскрыта первичная структура инсулина, Нобелевская премия 1958 года закрепила историческое место Сенгера в этом экстраординарном событии [16].

Вторая Нобелевская премия (1980) [14] была им получена за создание оригинального и поныне широко применяемого метода секвенирования нуклеотидных последовательностей. В это время он работал в Кембриджской лаборатории молекулярной биологии среди других знаменитостей, усиленно разрабатывавших преемственные проблемы бурно развивавшейся новой науки. Указанное открытие еще более упрочило авторитет и всемирное признание Сенгера.

Этому редкостному по своему таланту биохимику стали открыты многие истины. Так, например, помимо ряда методических новшеств, им был распознан кардинальный принцип линейных последовательностей, показанный сначала для белков, а затем нуклеотидов, что идет еще от Т.Х. Моргана.

Если вернуться опять к биографической книге Браунли [6], то нужно еще упомянуть следующее. По просьбе этого автора комментариев по поводу ее выхода и вообще о научном наследии Ф. Сенгера дали пять выдающихся молекулярных биологов, среди которых четыре были удостоены Нобелевской премии: Пол Берг, Элизабет Блэкберн, Джон Салстон, Пол Нерс. Особо следует отметить Пола Берга, который в 1980 году разделил Нобелевскую премию с Фредом Сенгером и Уолтером Гилбертом. Конечно, П. Берг подчеркнул значимость интервью ученого, взятых после отставки, в которых есть существенные детали личного характера, в особенности воспоминания о молодых годах. Но главное, безусловно, касается заключений Берга о сути открытий Сенгера. Во-первых, первопроходчество в химии белка. Помимо разработки прогрессивного метода секвенирования, важны акценты и приоритеты, в том числе в отношении непептидных связей, трехмерной конфигурации молекулярных структур, универсальности механизмов синтеза многочисленных клеточных белков со строгим порядком организации аминокислот. Во-вторых, активный переход ученого от химии белка к таковой нуклеиновых кислот — РНК и ДНК, куда он привнес свой богатый опыт секвенирования белковых молекул и где ему посчастливилось революционизировать методические подходы, особенно в плане их скорости и многоохватности, и таким образом еще раз обессмертить свое имя. В целом Пол Берг постарался найти подходящие возвышенные слова, чтобы охарактеризовать «замечательного человека, который изменил мир» [6, р. 164].

В мемориальной статье будет уместным для исторической полноты обратить внимание на еще одну сравнительно редко упоминаемую историческую деталь, отраженную в хронике нобелевских торжеств 1958 года. Это то, что в числе лауреатов того года в области

естествознания Сенгер оказался в окружении русских физиков, открывших эффект Вавилова — Черенкова (Тамм И.Е., Черенков П.А., Франк И.М.), и американских генетиков Дж.У. Бидла, Э.Л. Тейтема и Дж. Ледерберга (рис. 1).



Рис. 1. Лауреаты Нобелевской премии 1958 года. Слева направо: Бидл Дж.У., Тейтем Э.Л., Тамм И.Е., Сенгер Ф. (в центре), Черенков П.А., Франк И.М., Ледерберг Дж. [18]

Об этом ученом можно говорить бесконечно. Но хотелось бы еще отметить некоторые этические черты его личности и гражданскую позицию. Особенно показательным в данном отношении в исторической ретроспективе выглядит его официальное выступление в числе английских лауреатов Нобелевской премии против поддержки Великобританией войны США в Ираке в 2003 году. Известен также его отказ от почетного возведения в рыцарское звание, чтобы не именоваться «Сэр». Все это дополняет его образ многогранной, цельной, независимой личности, которой уготованы вечное общественное признание и память.

Конечно, важна также в воспитательном и методологическом смысле часть его автобиографических заметок, где говорится о годах простоя («неурожайных годах») после беспрецедентного интеллектуального рывка с расшифровкой структуры инсулина. Он предупреждает исследователей, что наука — это не череда сиюминутных, непрерывных успехов, а долговременный марафон, тяжелый, монотонный, изнурительный труд на

протяжении всей жизни, в котором, как и во всяком деле, перемежаются светлые и темные дни.

Он был во многом необычен. Даже неожиданный уход на пенсию в 65 лет, который считался экстраординарным для всемирно известного ученого, находит свое объяснение в его автобиографии. Он хорошо прочувствовал груз 40-летней напряженной работы, осознал неизбежный процесс старения и понял, что лучше уступить дорогу молодым [15].

Чтобы глубже понять ученого, по-видимому, будет нелишним привести несколько интересных, афористичных цитат, которые с наилучшей стороны характеризуют Сенгера:

- «Научное исследование является самым побудительным и вознаграждающим занятием».
- «Я верю, что мы занимаемся наукой в первую очередь не для того, чтобы достичь богатства или даже славы, но лишь потому, что мы заинтересованы в нашей работе, наслаждаясь процессом, и точно знаем, что это того стоит».

- «Установление структуры инсулина открывает ясный путь для аналогичных исследований других белков, и такие исследования уже ведутся в ряде лабораторий... Можно также надеяться, что эти исследования белков позволят выявить изменения, которые происходят при заболеваниях, и что наши усилия могут принести практическую пользу человечеству» (из Нобелевской речи 1958 года) [16].

В заключение следует указать на то, что полная библиография трудов Сенгера приводится в журнале «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова», 2008, Т. 4, № 3, С. 60–63 [2] и в биографии ученого на английском языке, написанной Браунли Дж. в 2014 году [6].

Литература

1. Воробьев В.С. Памяти Фредерика Сенгера (1918–2013) // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2013. — Т. 9. — № 4. — С. 75–77.
2. Воробьев В.С. Двойной нобелевский триумф Фредерика Сенгера: к 90-летию со дня рождения ученого // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2008. — Т. 4. — № 3. — С. 54–63.
3. Зеленин К.Н., Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. Нобелевские премии по химии за 100 лет. — СПб.: Изд-во «Гуманистика», 2003. — 872 с.
4. Лауреаты Нобелевской премии: Энциклопедия: М–Я / Пер. с англ. — М.: Прогресс, 1992. — С. 379–383.
5. Харгиттай И. Откровенная наука: Беседы с корифеями биохимии и медицинской химии / Ред. М. Харгиттай. — М.: Комкнига, 2006. — 544 с.
6. Brownlee G.G. Fred Sanger — Double Nobel Laureate. A biography. — Cambridge University Press, 2014. — XXVIII+196 p.
7. Brownlee G.G. Interview of Fred by the author in 1992 / In Brownlee G.G. Fred Sanger — Double Nobel Laureate. A biography. — Cambridge University Press, 2014. — P. 40–135.
8. Dodson G. Fred Sanger: sequencing pioneer // The Biochemist. — 2005 Dec. — Vol. 27. — P. 31–35.
9. Frederick Sanger [Internet] https://en.wikipedia.org/wiki/Frederick_Sanger.
10. Frederick Sanger interviewed by Alan Macfarlane, 24th August 2007 (film, one hour duration) (<http://www.alanmacfarlane.com/ancestors/sanger.htm>).
11. Frederick Sanger, Ph.D. — Academy of Achievement [Internet] <http://www.achievement.org/achiever/frederick-sanger-ph-d>.
12. Hargittai I. Interview with Frederick Sanger // The Chemical Intellegencer. Springer Verlag, New York. — 1999. — Vol. 5(2). — P. 6–11.
13. Sanger F. Biographical. The Nobel Prize in Chemistry. 1980 (<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1958/sanger/biographical/>).
14. Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. Nobel lecture. The Nobel Prize in Chemistry. 1980 / In: Les Prix Nobel en 1980. — Stockholm, 1981. (http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/).
15. Sanger F. Sequences, sequences, and sequences // Ann. Rev. Biochem. — 1988. — Vol. 57. — P. 1–28.
16. Sanger F. The chemistry of insulin. Nobel lecture. The Nobel Prize in Chemistry. 1958 / In: Les Prix Nobel en 1958. — Stockholm, 1959 (http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1958/).
17. Sanger F. The early days of DNA sequences // Nat. Med. — 2001. — Vol. 7. — P. 267–268.
18. https://nlmcmd.files.wordpress.com/2016/12/bbbaaz_.png.

TO THE 100TH ANNIVERSARY OF THE BIRTH OF FREDERICK SANGER — A GREAT CHEMIST OF THE 20TH CENTURY

V.S. VOROBYEV

Yu.A. Ovchinnikov Russian Biotechnological Society, Moscow

The work contains materials on the 100th anniversary of the birth of F. Sanger. The journal has already turned to the analysis of the life and work of this scientist [see 1, 2]. This article provides an additional comment.

Keywords: history of science, molecular biology, biographies, Frederick Sanger.

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

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

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



Подписано к печати 27.09.18
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

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

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

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

Главными целями деятельности ОБР являются:

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

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

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

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

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

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

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

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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