

УДК 677.047.254.13

# ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКОЙ ПОДГОТОВКИ ТЕКСТИЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ

*А.Л.Сибирев, К.К.Смирнов, С.А.Кокшаров*

Развивается новое направление получения биологически активных вспомогательных веществ непосредственно на текстильных предприятиях. На примере получения  $\alpha$ -амилазы продемонстрировано регулирование процесса жизнедеятельности штамма-продуцента *Bacillus subtilis* за счет воздействий электромагнитной природы. На основании анализа ростовых характеристик популяции выявлено преимущественное влияние внешних воздействий на фенотипический компонент системы - среду обитания микроорганизмов. Предложен метод магнитно-электрического потенцирования растворов для увеличения продуктивности и сроков использования микробиологических систем.

Перспективность развития биохимических технологий облагораживания текстильных материалов определяет актуальность решения вопросов обеспечения предприятий необходимыми биопрепаратами. Применение сухих ферментов сдерживается их высокой стоимостью, ограниченным сроком хранения. Химические методы стабилизации ферментативных продуктов сопряжены с уменьшением их активности. Указанные проблемы разрешимы при использовании свежих растворов ферментов.

Проводимые нами исследования ориентированы на создание средств и методов получения ферментативных фильтратов непосредственно на предприятиях, заинтересованных в их потреблении. Это позволило бы снизить себестоимость продукта за счет исключения стадии лиофильной сушки, оперативно регулировать объемы производства и потребления биопрепаратов в зависимости от рабочей программы предприятий, особенно в современных условиях аритмии их деятельности. В связи с этим актуально привлечение внимания химиков-текстильщиков к основным проблемам биотехнологии получения относительно нового класса ТВВ-ферментов.

Бурное развитие биотехнологий, в основе которых лежит эксплуатация микробиологических систем (штаммов-продуцентов), заставляет более внимательно относиться к фундаментальным биофизическим проблемам культивирования микроорганизмов или биохимическим реакциям ферментов. При культивировании штамма на величину экономического коэффициента (отношение выходной концентрации фермента, например,  $\alpha$ -амилазы, на один микроб) влияют внутрипопуляционные межклеточные связи. Если межклеточные каналы связи оптимальны с биофизических позиций, то популяция наращивает выходной продукт с максимальными показателями. Развитие системы во многом зависит от получения энергии для

жизнедеятельности клетки микроорганизма не только от биохимических превращений, но также и от подвода энергии извне, например, за счет биорезонансных явлений. Поскольку культивирование микроорганизмов происходит в водной питательной среде, то управление их жизнедеятельностью через изменение состояния растворов является весьма насущной, но слабо решаемой задачей. Вместе с тем в литературе имеется большое количество сведений о существенной восприимчивости биологических объектов к действию слабых магнитных полей [1,2].

Одна из основных сложностей культивирования микроорганизмов заключается в возможности сбоя продуктивности популяции микроорганизмов в связи с накоплением рефрактивных (покоящихся) клеток и непродуцентных кластеров живых (вегетативных) клеток. Согласно литературным данным и предварительным микробиологическим исследованиям воздействия слабых электрических и магнитных полей позволяют из покоящихся форм (споры, рефрактивные клетки) пополнять кластер живых клеток. При этом родительские особи вновь участвуют в репликации, создавая обновление (аутостабилизацию) генетического фонда популяции и продлевая срок ее эксплуатации.

В частности, нами проведена оценка ростовых характеристик штамма *Escherichia coli* (M17) при обработке питательной среды статическими электрическими и магнитными полями. Выбор такой тест-культуры обусловлен тем, что грамм-отрицательная палочка *E. coli* относится к энтеробактериям и обладает высокой приспособляемостью к изменяющимся условиям внешней среды обитания.

Выращивание тест-культуры проводили при  $t = 37^\circ\text{C}$  в течение 24 часов на мясо-пептонном агаре с дозированием инокулятивной (посевной) популяции не более 1000 клеток на чашечку Петри. Воздействие

электрического поля с параметрами  $U = 1,2 \text{ В}$ ,  $j = (3 \div 6) \cdot 10^{-5} \text{ А/см}^2$  осуществляли при помощи стерильных дисковых ( $S = 1 \text{ см}^2$ ) электродов в течение 60 мин после равномерного посева инокулята. Воздействие магнитного поля проводили с помощью постоянного магнита в течение всего времени развития популяции при величине магнитной индукции  $B = 24 \cdot 10^{-4} \text{ Тл}$ . Температуру поддерживали в воздушном термостате с точностью  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{С}$ . Сравнение контрольных и активированных процессов выполняли по величинам коэффициента выживаемости бактерий ( $K_{\text{КОЕ}}$ ) и относительного его изменения ( $Q_{\text{КОЕ}}$ ), а также относительного изменения числа колониеобразующих клеток вблизи электродов и полюсов  $dN_{\text{КОЕ}}^i$  (где  $i$  - катод или анод, северный N или южный S полюс):

$$K_{\text{КОЕ}} = (N_{\text{КОЕ}} / N) \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где  $N$  и  $N_{\text{КОЕ}}$  - соответственно, общее число клеток, рассеянных на площади чашки, и число КОЕ - колониеобразующих клеток (число колоний, подсчитываемых невооруженным глазом).

$$Q_{\text{КОЕ}} = [(\bar{K}_{\text{КОЕ}} - \bar{K}_{\text{КОЕ}}^*) / \bar{K}_{\text{КОЕ}}^*] \cdot 100 \%, \quad (2)$$

где  $\bar{K}_{\text{КОЕ}}$  и  $\bar{K}_{\text{КОЕ}}^*$  - среднестатистические величины коэффициента выживаемости, соответственно, после внешнего воздействия и в контрольных опытах.

$$dN_{\text{КОЕ}}^i = [(N_{\text{КОЕ}}^{\text{cp}} - N_{\text{КОЕ}}^i) / N_{\text{КОЕ}}^i] \cdot 100 \%, \quad (3)$$

где  $N_{\text{КОЕ}}^{\text{cp}}$  или  $N_{\text{КОЕ}}^i$  - соответственно, число колониеобразующих клеток в среднем по всей площади чашки или вблизи электродов и полюсов.

Всего было проведено 80 опытов. Расчетные величины, полученные при достаточной достоверности ( $p < 0,05$ ), сведены в табл. 1.

Таблица 1

#### Влияние статических полей на ростовые характеристики *E. coli*

Тип воздействия	$\bar{K}_{\text{КОЕ}}$ , %	$Q_{\text{КОЕ}}$ , %	$dN_{\text{КОЕ}}^i$			
			катод	(N-полюс)	анод	(S-полюс)
Контрольный опыт	45,5	-		-		-
Электрическое поле	80,3	76,3	61,3		38,7	
Магнитное поле	56,6	24,4		79,8		20,2

Повышение  $\bar{K}_{\text{КОЕ}}$  обусловлено увеличением вегетативных клеток в общей структуре популяции за счет пробуждения рефракtilной (покоящейся) части клеток. При воздействии электрического поля эффект выше, по сравнению с магнитным. Микроскопические исследования показали, что в первом случае возрастает количество мелких и средних по размерам колоний, а во втором - число средних и больших колоний. Следовательно, электрическое поле в большей мере вызывает пробуждение клеток, т.е. их акти-

вацию в латентном периоде, а магнитное поле преимущественно влияет на репродуктивные функции популяции. Четко видна поляризация роста популяции вблизи электродов и полюсов. На фоне общего увеличения числа колоний в анализируемых системах воздействие катодных процессов и N-полюса магнита оказывает более существенный стимулирующий (прототирующий) эффект, менее выраженный у анода или S-полюса магнита.

Таким образом, выявленные эффекты демонстрируют возможность энергетического управления жизнедеятельностью бактериальных популяций при их эксплуатации в биотехнологиях.

Бактериальная популяция неотделима от среды обитания (водных растворов). Как с теоретической, так и с практической точек зрения представляла интерес дифференциация воздействия внешних полей на генотипический (водная среда) и фенотипический (микроорганизм) компоненты системы.

В первой серии экспериментов производили обработку водного физиологического раствора (0,15 М р-р NaCl) с последующим помещением в него инокулята, выдержкой в течение 60 мин и рассеиванием на чашечки Петри. Во второй серии проводили активацию системы с микроорганизмами. Питательной средой является пивное сусло и крахмальный картофельный отвар в стандартном фосфорнокислом солевом буфере (pH = 6,7). Культивирование выполняли в воздушном термостате при  $t = 37 \text{ }^\circ\text{С}$ . Всего проведено 125 опытов.

Электрохимическую активацию (ЭХА) осуществляли в мембранном проточном двухэлектродном электролизере. Параметры воздействия: напряжение на ячейке  $U = 12 \div 100 \text{ В}$ ; плотность тока  $j = 0,3 \div 0,5 \text{ мА/см}^2$ ; потенциал анода  $E^a = 1,3 \div 1,6 \text{ В}$ ; катода  $E^k = 0,1 \div 0,4 \text{ В}$ ; скорость прокачки раствора  $V = 0,1 \div 0,3 \text{ л/мин}$ . Воздействие магнитным полем оказывали с помощью тороидальной электромагнитной системы с величиной магнитной индукции  $B = 115 \text{ мТл}$  при динамизации растворов прокачкой по силиконовой трубке со скоростью  $V = 0,1 \div 0,3 \text{ м/мин}$  с числом переполюсовок поля - 24 (МА - магнитная активация). Магнитно-электрическое потенцирование (МЭП) растворов проводили в термостатируемой ячейке с двумя золотыми электродами воздействием переменного векторного магнитного потенциала тороида и динамизации раствора в низкоградиентном переменном электрическом поле. Используются следующие параметры воздействия: эффективное значение вектора магнитной индукции  $B_m = (3 \div 6) \cdot 10^{-5} \text{ Тл}$ ; эффективное значение магнитного векторного потенциала  $A_m = (0,2 \div 0,4) \cdot 10^{-6} \text{ Вб/м}$ ; амплитудное значение градиента электрического поля  $E = 0,33 \text{ В/м}$ ; частотный диапазон  $f = 32 \div 4000 \text{ Гц}$ . Применяемый набор частот представлял собой линейчатый спектр гармоник, выстроенный относительно основного тона  $f_a = 333,3 \text{ Гц}$ , при котором наблюдается максимальная устойчивость динамических состояний водно-электролитных систем [3].

Таблица 2

**Расчетные величины ростовых характеристик штамма *Bacillus subtilis* при воздействии внешних слабых полей**

Тип воздействия	$\bar{K}_{\text{КОЕ}}$ (%) при обработке		$Q_{\text{КОЕ}}$ (%) при обработке		$dQ_{\text{КОЕ}}$ , % фенотип.
	физ. раствора	инокулята	физ. раствора	инокулята	
Контрольные опыты	-	80,5±9,5	-	-	-
ЭХА: анолит	88,8±4,3	91,3±4,2	+10,3	+13,4	23,1
ЭХА: католит	91,2±9,8	93,0±6,2	+13,3	+18,0	26,1
МА	86,9±3,7	88,7±4,1	+7,9	+10,2	29,5
МЭП: f = 32÷4000 Гц	85,3±2,7	86,0±2,9	+6,0	+6,8	11,7

Результаты исследования колониеобразования *B. subtilis* показывают (см. табл. 2), что используемый в работе штамм обладает высокой жизнедеятельностью (обычно среднее значение  $\bar{K}_{\text{КОЕ}} \leq 60 \div 70$  %). В сравнении с тест-культурой, изменения величины  $Q_{\text{КОЕ}}$  значительно ниже, но общие закономерности развития популяций при воздействии внешних полей аналогичны: ЭХА действует на лаг-фазу (фазу пробуждения клеток), а МА - в большей мере на репродуктивные функции.

При этом основной вклад в эффект вносит энергизация водной среды ( $dQ_{\text{КОЕ}} \gg 70 \div 88$  %). Следует отметить метод МЭП, для которого характерно максимальное (до 90 %) влияние на прирост колоний через энергизацию водной фазы, несмотря на довольно скромное относительное увеличение биомассы ( $Q_{\text{КОЕ}} \gg 6$  %). Вместе с тем этот метод обеспечивает существенное повышение активности продуцируемой  $\alpha$ -амилазы.

В табл. 3 обобщены результаты анализа кинетики роста биомассы по данным начальной ( $C_N^0$ ) и конечной ( $C_N^{24}$ ) концентрации клеток в культуральной жидкости и активности фермента ( $A^\Phi$ ), определяемой в условных единицах по методике [4].

Таблица 3

**Биоинформационное влияние энергизации питательной среды на рост популяции *Bacillus subtilis* и активность  $\alpha$ -амилазы**

Тип воздействия	$C_N^0 \cdot 10^{-6}$ , мл <sup>-1</sup>	$C_N^{24} \cdot 10^{-8}$ , мл <sup>-1</sup>	$dC_N$ , %	$A^\Phi$	$dA^\Phi$ , %
Контрольный опыт	2,3	0,6	100,0	120±5	100,0
ЭХА: анолит	4,1	1,2	112,7	133±25	110,8
ЭХА: католит	3,1	3,0	381,0	102±20	85,0
МА	3,9	1,1	108,5	142±15	118,3
МЭП: f=32÷4000 Гц	2,7	0,75	106,8	1000±120	833,3
f=32÷125 Гц	2,9	0,85	112,8	210±52	175,0
f=125÷1000 Гц	3,3	0,87	101,1	512±67	426,7
f=1000÷4000 Гц	3,15	0,80	97,2	923±115	770,0

При анализе динамики роста популяции *B. subtilis* в контрольном опыте определена продолжитель-

ность лаг-фазы 5,5-6 часов; в предлогарифмической фазе скорость нарастания численности клеток составляет  $dC_N/dt = 0,3 \cdot 10^6$  мл<sup>-1</sup> · час<sup>-1</sup>; максимальное значение в логарифмическом периоде  $dC_N/dt = 8 \cdot 10^6$  мл<sup>-1</sup> · час<sup>-1</sup>. В фазе преднасыщения, т.е. на выходе в фазу максимальной концентрации биомассы, скорость роста снижается, но ранее достигается максимальное значение активности фермента в культуральном растворе.

После обработки инокулята анолитом наблюдается снижение продолжительности лаг-фазы до 4,5-5 часов и повышение к конечному времени относительной урожайности на 12,7 %. Развитие происходит при увеличении скорости  $dC_N/dt = 17 \cdot 10^6$  мл<sup>-1</sup> · час<sup>-1</sup>, на 10,8 % возрастает активность фермента. Сильное воздействие на рост биомассы в условиях ее культивирования оказывает катодная обработка питательной среды, относительный прирост  $dC_N$  достигает 28 %, при этом сокращается лаг-фаза до 3 часов и увеличивается скорость роста клеток до  $dC_N/dt = 43,7 \cdot 10^6$  мл<sup>-1</sup> · час<sup>-1</sup>. Однако при этом активность фермента падает на 15 %. Методы МА и МЭП питательной среды на кинетические параметры и выход биомассы по сравнению с ЭХА влияют незначительно. В зависимости от частотного диапазона МЭП возможно как промотирование (Нч-диапазон), так и ингибирование (Вч-диапазон) указанного процесса (см. табл. 3). Вместе с тем налицо резкое (в 7 раз) повышение активности фермента. Такое изменение состояния  $\alpha$ -амилазы в культуральной жидкости трудно предсказать а priori. Объяснение этому, по всей вероятности, нужно искать в явлениях биорезонанса [5] и адаптивной диссоциации популяции.

Таким образом, управление развитием микробной популяции можно осуществлять генотипически, что реализуемо в реальных процессах продуцирования  $\alpha$ -амилазы. Применение метода магнитно-электрического потенцирования питательных растворов может существенно повысить биоэкономичность технологии получения ферментативных фильтратов, применяемых в процессах биохимической подготовки целлюлозных текстильных материалов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Плеханов Г.Ф., Опалинская А.Н. Влияние экранирования от геомагнитного поля и искусственного МП на флуктуацию реакции Пиккарди // Влияние естественных и искусственных МП на биообъекты. - Белгород, 1973. - С. 21-23.
2. Аристархов В.А., Пирузян Л.А. О возможном молекулярном механизме биологического действия МП // Физико-математические и биологические проблемы действия электромагнитных полей и ионизации воздуха. - М.: Наука, 1975, т.1. - С. 179.
3. Сибирев А.Л., Кокшаров С.А. Адсорбционное поведение катионов щелочных металлов на платиновом электроде при воздействии слабых магнитных полей // Тез. докл. VI Междунар. конф. «Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах». - Иваново, 1995. - С. 58-59.
4. Рухлядева А.П., Горячева М.Г. Метод определения амилолитических ферментов // Ферментная и спиртовая промышленность. - М.: ЦНИИТЭИлегпром, 1966, вып. 1. - С. 9-11.
5. Сирил Смит. Электромагнитная биоинформация и вода. - Вестник биофизической медицины, 1994, N 1. - С. 3-13.

*Институт химии неводных растворов РАН,  
Ивановская государственная медицинская академия*

Получено 20.11.96 г.

## ELECTROMAGNETIC ACTION EFFICIENCY IN DEVELOPMENT OF COMPOSITIONS FOR BIOCHEMICAL PREPARATIONS OF TEXTILE MATERIALS

*A.L.Sibirev, K.K.Smirnov, S.A.Koksharov*

A new direction is developed to prepare biologically active textile auxiliaries directly in textile shops. With alpha-amylase production as an example, regulation of vital activity processes of a *Bacillus subtilis* producer strain by electromagnetic effects is demonstrated. By analysis of growth characteristics of the strain, predominant influence of external effects on the habitat as a genotype component of the system is discovered. A method of electromagnetic potentiation of solutions to increase productivity and period of a microbiological systems application is proposed.

УДК 678.7:677.021.125.54

## ГЕТЕРОГЕННАЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ ПРОДУКТОВ КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗА ПОЛИВИНИЛАЦЕТАТА ЦИНК- И КАЛЬЦИЙСОДЕРЖАЩИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

*Г.А.Смирнов, Е.А.Индейкин, Н.В.Рыбин, Е.В.Кострюкова*

С целью разработки процесса получения водорастворимого сополимера винилового спирта и винилацетата путем гидролиза поливинилацетата в водной дисперсии с катализом *o*-фосфорной кислотой изучена гетерогенная нейтрализация продуктов гидролиза поливинилацетата цинк- и кальцийсодержащими соединениями. Установлены составы продуктов нейтрализации - водных и твердых фаз. Показано, что с использованием в качестве нейтрализующих агентов оксида цинка, цинксодержащего отхода, карбоната и гидроксида кальция продукты гидролиза поливинилацетата могут быть очищены от фосфат-ионов.

Ранее нами было показано [1, 2], что водорастворимые сополимеры винилового спирта (ВС) и винилацетата (ВА), полученные гидролизом поливинил-

ацетата (ПВА) в водной дисперсии при катализе фосфорной кислотой с очисткой диализом через полупроницаемую мембрану, могут быть использованы