



FOOD METAENGINEERING

Пищевая Метаинженерия

Volume 2 | Issue 1 | 2024



■ FOOD METAENGINEERING

Научный рецензируемый журнал
No 4 | 2023
Периодичность издания — 4 номера в год
Основан в 2023 г.

■ Учредитель:

Федеральное государственное автономное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

■ Главный редактор

Галстян Арам Генрихович — доктор технических наук, академик РАН, профессор РАН, директор Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (Москва, Россия) (ORCID)

■ РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Заведующий редакцией журнала, академический редактор

Тихонова Елена Викторовна — кандидат исторических наук, доцент, Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (Москва, Россия) (ORCID)

Ответственный секретарь

Рябова Анастасия Евгеньевна — кандидат технических наук, Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (Москва, Россия) (ORCID)

Редактор по этике

Косычева Марина Александровна — доцент, кандидат филологических наук, доцент Российского биотехнологического университета (Москва, Россия) (ORCID)

- Рецензируемый научный журнал FOOD METAENGINEERING («ПИЩЕВАЯ МЕТАИНЖЕНЕРИЯ») зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 13 марта 2023 года (Свидетельство о регистрации Эл № ФС77-84878 — сетевое издание).

■ Адрес:

115093, г. Москва, ул. Люсиновская, д. 35, корп. 7, к. 406
Тел. +7 (499) 236-32-23
E-mail: fme@vnimi.org
Официальный сайт учредителя: vnimi.org
Официальный сайт редакции: fme-journal.org

© ФГАНУ «ВНИМИ», 2023
Опубликовано 01.05.2024

■ FOOD METAENGINEERING

Scientific peer-reviewed journal
No 4 | 2023
Periodicity of publication — 4 issues per year
Published since 2023

■ Founder:

All-Russian Dairy Research Institute (VNIMI)

■ Editor-in-Chief

Aram G. Galstyan — Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Engineering, Professor, Director of the All-Russian Scientific Research Institute of the Dairy Industry (Moscow, Russia) (ORCID)

■ EDITORIAL OFFICE

Head of the Editorial Team, Academic Editor

Elena V. Tikhonova — Cand. Sci. (History), Assistant professor, All-Russian Dairy Research Institute (Moscow, Russia) (ORCID)

Executive Secretary

Anastasiia Riabova — Cand. Sci. (Engineering), All-Russian Dairy Research Institute (Moscow, Russia) (ORCID)

Editor by Ethics

Marina A. Kosycheva — Cand. Sci. (Philology), Assistant professor, Russian Biotechnological University, (Moscow, Russia) (ORCID)

- The Journal is registered by the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communication, Information Technologies and Mass Media. The Mass Media Registration Certificate EL No FS77–84878 dated March 13, 2023.

■ Address:

406 room, 35/7, Lyusinovskaya st., Moscow, Russian Federation, 115093
Tel. +7 (499) 236-32-23
E-mail: fme@vnimi.org
Official web site of Founder: vnimi.org
Official web site of the Editorial Office: fme-journal.org

© VNIMI, 2023
Published 01.05.2024

- **Бабич Ольга Олеговна** —
доцент, доктор технических наук, директор Научно-образовательного центра «Промышленные биотехнологии» Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта» (Калининград, Россия) (ORCID)
- **Багиров Вугар Алинияз оглы** —
член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, директор Департамента координации деятельности организаций в сфере сельскохозяйственных наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Москва, Россия) (ORCID)
- **Будрик Владислав Глебович** —
кандидат технических наук, директор Всероссийского научно-исследовательского института птицеперерабатывающей промышленности — филиала Всероссийского научно-исследовательского и технологического института птицеводства РАН (Ржавки, Россия) (ORCID)
- **Донник Ирина Михайловна** —
академик РАН, профессор, доктор биологических наук, помощник президента НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия) (ORCID)
- **Евдокимов Иван Алексеевич** —
член-корреспондент РАН, профессор, доктор технических наук, заведующий базовой кафедрой технологии молока и молочных продуктов Северо-Кавказского федерального университета (Ставрополь, Россия) (ORCID)
- **Линденбек Марио** —
доктор сельскохозяйственных наук, Business consulting Lindenbeck (Берлин, Германия) (ORCID)
- **Лобачевский Яков Петрович** —
академик РАН, профессор, доктор технических наук, первый заместитель директора Федерального научного агроинженерного центра ВИМ (Москва, Россия) (ORCID)
- **Мартиросян Владимир Викторович** —
профессор РАН, доктор технических наук, заместитель директора по научной работе Научно-исследовательского института хлебопекарной промышленности (Москва, Россия) (ORCID)
- **Мельникова Елена Ивановна** — профессор, доктор технических наук, профессор кафедры технологии продуктов животного происхождения Воронежского государственного университета инженерных технологий (Воронеж, Россия) (ORCID)
- **Петров Андрей Николаевич** —
академик РАН, доктор технических наук, главный научный сотрудник Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (Москва, Россия) (ORCID)
- **Просеков Александр Юрьевич** —
член-корреспондент РАН, профессор РАН, профессор, доктор технических наук, доктор биологических наук, ректор Кемеровского государственного университета (Кемерово, Россия) (ORCID)
- **Семипятный Владислав Константинович** — доктор технических наук, старший научный сотрудник Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (Москва, Россия) (ORCID)
- **Серба Елена Михайловна** —
член-корреспондент РАН, профессор РАН, доцент, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе Всероссийского научно-исследовательского института пищевой биотехнологии филиала Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи (Москва, Россия) (ORCID)
- **Сложенкина Марина Ивановна** —
член-корреспондент РАН, профессор РАН, профессор, доктор биологических наук, директор Поволжского научно-исследовательского института производства и переработки мясомолочной продукции (Волгоград, Россия) (ORCID)
- **Федотова Ольга Борисовна** —
старший научный сотрудник, доктор технических наук, ведущий научный сотрудник/ученый секретарь Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (Москва, Россия) (ORCID)
- **Чернуха Ирина Михайловна** —
академик РАН, профессор, доктор технических наук, руководитель отдела координации международных и инициативных проектов Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН (Москва, Россия) (ORCID)

■ **Olga O. Babich** —

Associate Professor, Doctor of Engineering, Director of the Scientific and Educational Center «Industrial Biotechnologies», Immanuel Kant Baltic Federal University (Kaliningrad, Russia) (ORCID)

■ **Vugar A. Bagirov** —

Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Biological Sciences, Director of the Department for Coordinating the Activities of Organizations in the Field of Agricultural Sciences, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Moscow, Russia) (ORCID)

■ **Vladislav G. Budrik** —

Cand. Sci. (Engineering), Director of the All-Russian Research Institute of the Poultry Processing Industry, All-Russian Research and Technological Institute of Poultry Farming of the Russian Academy of Sciences (Rzhavki, Russia) (ORCID)

■ **Irina M. Donnik** —

Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Biological Sciences, presidential aide, National Research Center «Kurchatov Institute» (Moscow, Russia) (ORCID)

■ **Ivan A. Evdokimov** —

Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Engineering, Head of the Basic Department of Technology of Milk and Dairy Products, North Caucasian Federal University (Stavropol, Russia) (ORCID)

■ **Mario Lindenbeck** —

Doctor of Agricultural Sciences, Business Consulting Lindenbeck (Berlin, Germany) (ORCID)

■ **Yakov P. Lobachevsky** —

Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Engineering, First Deputy Director of the Federal Scientific Agroengineering Center VIM (Moscow, Russia) (ORCID)

■ **Vladimir V. Martirosyan** —

Professor of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Engineering, Deputy Director for Research, Scientific Research Institute of the Baking Industry (Moscow, Russia) (ORCID)

■ **Elena I. Melnikova** —

Professor, Doctor of Engineering, Professor of the Department of Technology of Animal Origin Products, Voronezh State University of Engineering Technologies (Voronezh, Russia) (ORCID)

■ **Andrey N. Petrov** —

Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Engineering, Chief Researcher, All-Russian Scientific Research Institute of the Dairy Industry (Moscow, Russia) (ORCID)

■ **Alexander Yu. Prosekov** —

Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Engineering, Doctor of Biological Sciences, Rector of Kemerovo State University (Kemerovo, Russia) (ORCID)

■ **Vladislav K. Semipyatny** —

Doctor of Technical Sciences, Senior Researcher of the All-Russian Scientific Research Institute of the Dairy Industry (Moscow, Russia) (ORCID)

■ **Elena M. Serba** —

Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences, Associate Professor, Doctor of Biological Sciences, Deputy Director for Research, All-Russian Research Institute of Food Biotechnology, Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety (Moscow, Russia) (ORCID)

■ **Marina I. Slozhenkina** —

Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Biological Sciences, Director of the Volga Research Institute for the Production and Processing of Meat and Dairy Products (Volgograd, Russia) (ORCID)

■ **Olga B. Fedotova** —

Senior Researcher, Doctor of Engineering, Leading Researcher / Scientific Secretary of the All-Russian Scientific Research Institute of the Dairy Industry (Moscow, Russia) (ORCID)

■ **Irina M. Chernukha** —

Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Engineering, Head of the Department for Coordinating International and Initiative Projects, Federal Scientific Center for Food Systems named after V. M. Gorbатов, Russian Academy of Science (Moscow, Russia) (ORCID)

РЕДАКТОРСКАЯ СТАТЬЯ

А. Е. Рябова
Использование искусственного интеллекта при написании научных статей 7

ОРИГИНАЛЬНОЕ ЭМПИРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Д. М. Мясенко, О. Б. Федотова, А. А. Агарков, С. С. Сиротин
Разработка модифицированного упаковочного материала с антиоксидантной направленностью
и исследование его санитарно-гигиенических показателей 11

Л. С. Дышлюк, Е. В. Ульрих, С. В. Агафонова, О. В. Казимирченко
Фракционный состав и ксиланолитическая активность белков, продуцируемых бактериями, выделенными из лигноцел-
люлозной биомассы 23

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

А. Ю. Просеков
Применение методов *omics* в изучении эндофитных микроорганизмов: обзор предметного поля 34

С. А. Сухих, Е. В. Ульрих, С. Ю. Носкова, О. Б. Калашникова, О. О. Бабич
Клеточное выращивание мяса: обзор предметного поля 51

EDITORIAL

Anastasia E. Ryabova

The Application of Artificial Intelligence in Scientific Papers Writing..... 7

ORIGINAL EMPIRICAL RESEARCH

Dmitry M. Myalenko, Olga B. Fedotova, Aleksandr A. Agarkov, Sergey S. Sirotin

Development of a Modified Packaging Material with Antioxidant Properties and the Study of its Sanitary and Hygienic Parameters..... 11

Lyubov S. Dyshlyuk, Elena V. Ulrikh, Svetlana V. Agafonova, Oksana V. Kazimirchenko

Fractional Composition and Xylanolytic Activity of Proteins Produced by Bacteria Isolated from Lignocellulosic Biomass..... 23

REVIEW

Alexander Yu. Prosekov

Application of Omics Methods in the Study of Endophytic Microorganisms: A Scoping Review 34

Stanislav A. Sukhikh, Elena V. Ulrikh, Svetlana Yu. Noskova, Olga B. Kalashnikova, Olga O. Babich

Cellular Meat Cultivation: A Scoping Review 51

Использование искусственного интеллекта при написании научных статей

А. Е. Рябова

Всероссийский
научно-исследовательский
институт молочной
промышленности, г. Москва,
Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

В редакционной статье описываются вызовы, с которыми сталкиваются современные научные журналы в контексте роста возможностей и доступности искусственного интеллекта. Приводятся образцы дисклеймеров, комментирующих использование авторами инструментов искусственного интеллекта.

Ключевые слова: искусственный интеллект, дисклеймеры, Chat GPT, статус автора научной статьи

Корреспонденция:

Анастасия Евгеньевна Рябова,
E-mail: a_ryabova@vnimi.org

Конфликт интересов:

автор сообщает
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 01.02.2024

Принята: 15.03.2024

Опубликована: 30.03.2024

Copyright: © 2024 Автор



Для цитирования: Рябова А. (2024). Использование искусственного интеллекта при написании научных статей. *FOOD METAENGINEERING*, 2(1), 7-10.
<https://doi.org/10.37442/fme.2024.1.51>

<https://doi.org/10.37442/fme.2024.1.51>

The Application of Artificial Intelligence in Scientific Papers Writing

Anastasia E. Ryabova

All-Russian Dairy Research Institute,
Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

This editorial article describes the challenges faced by modern scientific journals in the context of the increasing capabilities and accessibility of artificial intelligence. Examples of disclaimers regarding authors' use of artificial intelligence tools are provided.

Keywords: artificial intelligence, disclaimers, Chat GPT, scientific article authorship

Correspondence:

Anastasia E. Ryabova,
E-mail: a_ryabova@vnimi.org

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 01.02.2024

Accepted: 15.03.2024

Published: 30.03.2024

Copyright: © 2024 The Author



To cite: Ryabova, A.E. (2024). The application of artificial intelligence in scientific papers writing. *FOOD METAENGINEERING*, 2(1), 7-10.
<https://doi.org/10.37442/fme.2024.1.51>

Редакции научных журналов сталкиваются сегодня с возрастающим интересом к использованию инструментов искусственного интеллекта, таких как Chat GPT, в процессе подготовки научных статей. Хотя эти технологии и предлагают впечатляющие возможности для улучшения качества текста, важно чётко понимать их роль в процессе научного письма.

В контексте научной публикации Chat GPT не может выступать в качестве автора или соавтора статьи (Hufton, 2023). Ответственность за содержание, оригинальность, достоверность данных и выводов лежит непосредственно на авторах. Все участники, внесшие значимый вклад в исследование и написание статьи, должны быть указаны как авторы или в благодарностях в зависимости от степени их участия (Tikhonova & Raitskaya, 2023).

Использование текста, сгенерированного чатом, в качестве первоисточника сталкивается с несколькими серьёзными проблемами. Во-первых, AI может генерировать информацию, опираясь на обширный набор данных, который не всегда актуален или точен, что может привести к распространению ошибочной или устаревшей информации. Во-вторых, AI не способен к критическому анализу или интерпретации данных так, как это может сделать исследователь, что может привести к упущению важных аспектов или нюансов изучаемой темы. Кроме того, тексты, сгенерированные AI, могут не соответствовать требованиям к оригинальности, поскольку AI формирует ответы, опираясь на уже существующий контент, что в свою очередь может привести к нарушениям авторских прав и плагиату (Alasadi & Baiz, 2023).

Мы признаем, что инструменты такие как Chat GPT могут быть полезны для стилистических правок и улучшения качества языка. Однако, если авторы используют подобные инструменты, необходимо чётко указать это в примечаниях к статье, описав цели их применения. Это обеспечит прозрачность научного процесса и поможет поддерживать академическую честность (Lund et al., 2023).

Важно, чтобы авторы четко указывали, в какой стадии подготовки рукописи и для каких целей использовались инструменты AI, подчеркивая, что основной аналитический и критический анализ, а также интерпретация результатов исследования проводились самими авторами. Например,

- (1) В дисклеймерах: «В процессе подготовки данной статьи использовались инструменты искусственного интеллекта (указать — какие именно) для оптимизации структуры текста и повышения индекса его читабельности. Ответственность за интерпретацию данных, выводы и рекомендации полностью лежит на авторах».
- (2) В разделе «Ограничения исследования»: При подготовке литературного обзора использовался AI инструмент для предварительного отбора и аннотирования научных публикаций, что потенциально могло влиять на выбор и интерпретацию источников. Все выбранные источники были тщательно пересмотрены авторами, чтобы гарантировать их актуальность и соответствие теме исследования. Авторы подтверждают, что использование AI служило только в качестве дополнительного инструмента для ускорения исследовательского процесса и не заменяло критический анализ и синтез полученной информации, выполняемый вручную.»

Использование Chat GPT или аналогичных технологий в секциях, касающихся представления результатов исследования и дискуссии, категорически запрещено. Такое применение подразумевает риск искажения научных данных и выводов, что противоречит принципам достоверности и надёжности научной работы.

Редакция журнала FOOD METAENGINEERING поощряет инновации и использование новых технологий в научной работе, однако призывает авторов обеспечивать высокие стандарты академической этики. Мы стремимся поддерживать и развивать культуру научного сообщества, где ценится подлинность и прозрачность научного вклада.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Tikhonova, E., & Raitskaya, L. (2023). ChatGPT: Where Is a silver lining? Exploring the realm of GPT and large language models. *Journal of Language and Education*, 9(3), 5–11. <https://doi.org/10.17323/jle.2023.18119>
- Alasadi, E.A., & Baiz, C.R. (2023). Generative AI in education and research: Opportunities, concerns, and solutions. *Journal of Chemical Education*, 100(8), 2965–2971. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.3c00323>
- Huften, A.L. (2023). No artificial intelligence authors, for now. *Patterns*, 4, 14. <https://doi.org/10.1016/j.patter.2023.100731>
- Lund, B.D., Wang, T., Mannuru, N.R., Nie, B., Shimray, S., & Wang, Z. (2023). ChatGPT and a new academic reality: Artificial Intelligence-written research papers and the ethics of the large language models in scholarly publishing. *Journal of the Association for Information Science and Technology*, 74(5), 570–581. <https://doi.org/10.1002/asi.24750>

Разработка модифицированного упаковочного материала с антиоксидантной направленностью и исследование его санитарно-гигиенических показателей

Д. М. Мяленко, О. Б. Федотова, А. А. Агарков, С. С. Сиротин

Всероссийский
научно-исследовательский
институт молочной
промышленности, г. Москва,
Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: Разработка и использование в качестве упаковочных материалов, наполненных модифицированных полиолефиновых пленок, является перспективным направлением развития и совершенствования современной упаковки для пищевой, в частности, молочной продукции. За счет целевой модификации, возможно создание, так называемой «активной упаковки», обладающей комплексом требуемых свойств. Актуальной является упаковка, в состав которой введены вещества, обладающие антимикробным и/или антиоксидантным действием, проявляющимся при ее контакте с упакованным продуктом.

Цель: Изучение влияния наполнения полиэтиленовой пленки карбонатом кальция и антиоксидантом-дигидрохверцетином на комплекс ее санитарно-гигиенических показателей

Материалы и методы: Объектами исследований были выбраны образцы разработанной пленки, наполненной карбонатом кальция (CaCO_3) и дигидрохверцетином (ДКВ). Разработку и получение материала осуществляли на экспериментальном участке с использованием лабораторного экструдера модели SJ-28. Производство образцов пленки осуществляли с использованием предварительно подготовленного суперконцентрата. Санитарно-химические и органолептические исследования проводили в соответствии с требованиями ТРТС 005/2011 «О безопасности упаковки» и ГОСТ 34174-2017 и инструкции Минздрава МИ 880-71.

Результаты: Использование методологии совмещения в расплаве полимерной основы, минерального и органических наполнителей, позволило получить модифицированный пленочный упаковочный материал. Предложен алгоритм технологии и отработаны режимы получения образцов при варьировании содержания вводимых веществ. Проведены органолептические и санитарно-химические исследования полученных образцов, подтвердившие их санитарно-гигиеническую безопасность при выбранных концентрациях наполнителей и режимах экструзии.

Выводы: Полученные данные по получению наполненной модифицированной пленки показали технологическую адекватность выбранного способа, режимов и ее компонентного состава. Проведенные комплексные органолептические и санитарно-химические исследования показали отсутствие сверхнормативного запаха и отсутствие миграции низкомолекулярных веществ и продуктов окисления в модельные среды

Ключевые слова: активная упаковка; модифицированные полиолефиновые пленки; антиоксидантные свойства; карбонат кальция; дигидрохверцетин; санитарно-гигиеническая безопасность; упаковочные материалы; упаковка для пищевых продуктов

Корреспонденция:
Дмитрий Михайлович Мяленко
E-mail: d_myalenko@vnimi.org

Конфликт интересов:
авторы сообщают
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 13.12.2024
Принята: 15.03.2024
Опубликована: 30.03.2024

Copyright: © 2024 Авторы



Для цитирования: Мяленко, Д. М., Федотова, О. Б., Агарков, А. А., & Сиротин, С. С. (2024). Разработка модифицированного упаковочного материала с антиоксидантной направленностью и исследование его санитарно-гигиенических показателей. *FOOD METAENGINEERING*, 2(1), 11-222.
<https://doi.org/10.37442/fme.2024.1.47>

Development of a Modified Packaging Material with Antioxidant Properties and the Study of its Sanitary and Hygienic Parameters

Dmitry M. Myalenko, Olga B. Fedotova, Aleksandr A. Agarkov, Sergey S. Sirotin

All-Russian Dairy Research Institute,
Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: The development and use of modified polyolefin films as packaging materials represent a promising direction for the development and improvement of modern packaging for food, particularly dairy products. Through targeted modification, it is possible to create so-called "active packaging," which has a range of desired properties. Packaging that includes substances with antimicrobial and/or antioxidant effects, which manifest upon contact with the packaged product, is of current interest.

Purpose: To study the impact of filling polyethylene film with calcium carbonate and the antioxidant dihydroquercetin on its sanitary and hygienic properties.

Materials and Methods: The research objects were samples of developed film filled with calcium carbonate (CaCO_3) and dihydroquercetin (DHQ). The material was developed and produced on an experimental site using an SJ-28 laboratory extruder. The film samples were produced using a pre-prepared superconcentrate. Sanitary-chemical and organoleptic studies were conducted in accordance with TR TS 005/2011 "On Packaging Safety," GOST 34174-2017, and the Ministry of Health instruction MI 880-71.

Results: The methodology of combining a polymer base with mineral and organic fillers in a melt allowed for the creation of a modified film packaging material. A technological algorithm was proposed, and production modes were developed for obtaining samples with varying filler content. Organoleptic and sanitary-chemical studies of the obtained samples confirmed their sanitary-hygienic safety at the selected filler concentrations and extrusion modes.

Conclusion: The obtained data on the filled modified film indicated the technological adequacy of the selected method, modes, and composition. Comprehensive organoleptic and sanitary-chemical studies demonstrated no excessive odor and no migration of low-molecular-weight substances or oxidation products into model media.

Keywords: active packaging; modified polyolefin films; antioxidant properties; calcium carbonate; dihydroquercetin; sanitary and hygienic safety; packaging materials; food packaging

Correspondence:

Dmitry M. Myalenko,
E-mail: d_myalenko@vnimi.org

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 13.12.2023

Accepted: 15.03.2024

Published: 30.03.2024

Copyright: © 2024 The Authors



To cite: Myalenko, D. M., Fedotova, O. B., Agarkov, A. A., & Sirotin, S. S. (2024). The development of a modified packaging material with antioxidant properties and the study of its sanitary and hygienic characteristics. *FOOD METAENGINEERING*, 2(1), 11-25. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.1.47>

ВВЕДЕНИЕ

Полимерные материалы производятся и потребляются сегодня в огромных количествах. Однако они редко используются в чистом виде, обычно их смешивают с минеральными наполнителями (Nowaczyk et al., 2004). Свойства наполненных пластиков определяются свойствами полимера, свойствами наполнителя, объемными долями составляющих ее композицию, а также взаимодействиями полимер-наполнитель и наполнитель-наполнитель (Maurer et al., 1985; Rothon, 1999). Взаимодействие молекул полимера с неорганическими наполнителями может влиять на их свойства на микро-скопическом уровне (кристалличность, молекулярная динамика и проч.) и на макро-скопическом уровне (жесткость, твердость, ударная вязкость) (Hadal & Misra, 2004; Maurer et al., 1985; Nowaczyk et al., 2004; Rothon, 1999; Thio et al., 2002a).

Классическим примером модифицированных упаковочных систем для молочной и пищевой продукции служит пленка полиэтиленовая наполненная, которая давно серийно производится и используется для изготовления пакетов и розлива молока и кисломолочных напитков. В качестве наполнителей в ней использован мелкодисперсный диоксид титана и пищевая сажа (Arif et al., 2023; Boutillier et al., 2021; Thio et al., 2002a). Также данные наполнители, применяются для наполнения листовых полимерных материалов из полистирола и полипропилена из которых производят термоформованную упаковку — стаканчики, коробочки и т.п. (Мясенко & Федотова, 2022).

Использование приема наполнения полимерной матрицы минеральными, неорганическими и органическими наполнителями позволяет создавать материалы с новыми свойствами для различных отраслей промышленности. Композиции наполнителей придают полимерам новые свойства и, при грамотной реализации технологии, могут перерабатываться на стандартном оборудовании (Тимошков & Коган, 2013; Хатко & Ашинова, 2016).

Относительно безопасности диоксида титана не прекращаются дискуссии ученых всего мира, в связи с чем, целесообразно рассмотрение альтернативных вариантов введения других компонентов в состав упаковочных материалов, при этом, учитывается доступность, функциональность и экономичность. Карбонат кальция (мел) относится к доступным источникам минеральных наполнителей, также, придает белый цвет изделиям, в которых

используется (Hadal & Misra, 2004; Rothon, 1999; Thio et al., 2002a). Освоение производства полимерных материалов, наполненных карбонатом кальция началось относительно недавно. Примером упаковки, в составе которой он используется, является упаковка Ecolean.

Особо актуальным направлением является разработка упаковки, обеспечивающей гарантированную сохранность пищевого продукта в течение его жизненного цикла. Это, так называемая, «активная» упаковка. К данному виду относят антимикробные материалы, подавляющие развитие нежелательной микрофлоры на поверхности упакованных пищевых продуктов и предотвращающие их поверхностную порчу (Пряничникова 2020a; 2020b; Фильчакова 2008; Федотова, 2008; Kirsh et al., 2020). Молочная продукция относится к категории продукции недлительного хранения и подвержена различным порокам (Illarionova et al., 2020; Zobkova et al., 2018, Юрова, 2019).

Для продуктов твердообразной консистенции с развитой поверхностью разработаны упаковочные решения, содержащие антимикробный агент, который мигрирует (выпотевает) из материала упаковки на продукт в течение времени их контакта, тем самым стабилизируя продукт и предотвращая его порчу (Чеботарь и соавт., 1999; Fedotova & Pryanichnikova, 2021).

Некоторым продуктам, в частности, сливочному маслу, свойственна поверхностная порча — окисление молочного жира. При этом образуется пленка, называемая штафф (Зобкова 2006). В связи с этим, актуальным направлением научных и технологических исследований может быть создание упаковочных материалов с антиоксидантными свойствами, подавляющими процессы поверхностного окисления. При создании таких пленок целесообразно использование методологии совмещения в расплаве, предложенной для создания антимикробных модифицированных материалов (Сидорин, 2014; Федотова et al., 2010).

Доказано, что взаимодействие между молекулами полимера и неорганическими наполнителями может влиять на их механические свойства (Bartczak et al., 1999; Thio et al., 2002b; Tiemprateeb et al., 2000; Тимошков & Коган, 2013; Хатко & Ашинова, 2016). Однако вопросы санитарно-гигиенической безопасности наполненных функциональными органическими и неорганическими компонентами полимерных композиций подробно не изучены.

Создание новых композиций наполнителей и модификаторов и введение их в полимерную основу позволяет получить новые упаковочные материалы с новыми свойствами, однако, единым остается соблюдение требований к безопасности упаковки, в частности, к ее санитарно-гигиеническим свойствам. В состав санитарно-гигиенических испытаний входит органолептическая оценка водных вытяжек из образцов и санитарно-химические исследования миграции низкомолекулярных соединений. Исследования проводятся с использованием моделирования потенциального контакта материала упаковки с модельными средами в течение определенной экспозиции. Поскольку в состав любого упаковочного полимерного материала входит значительное количество веществ, способных мигрировать в контактирующие среды при определенных условиях, основной задачей данных исследований является их определение. Кроме того, при эксплуатации упаковки возможна частичная деструкция материала, из которого она изготовлена с образованием низкомолекулярных соединений, также, способных мигрировать, и образование продуктов окисления, например, формальдегида. Цель настоящего исследования — изучение влияния наполнения полиэтиленовой пленки карбонатом кальция и антиоксидантом-дигидрокверцетином на комплекс ее органолептических и санитарно-химических показателей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объектами исследований были выбраны образцы разработанной пленки, наполненной карбонатом кальция (CaCO_3) и дигидрокверцетином (ДКВ). Для получения пленки использован полиэтилен высокого давления (ПЭВД), марки 15803–20 по ГОСТ 16337–2022 высшего сорта. Показатель текучести расплава ПТР (г/10 мин) 0,917–0,921 (изготовитель ПАО «Сибур Холдинг»).

В качестве наполнителей использовали карбонат кальция фирмы «Будьэко», Белгородская область, Россия и дигидрокверцетин (Лавитол), производства АО «Аметис», Амурская область.

Разработку и получение материала осуществляли на экспериментальном участке с использованием лабораторного экструдера с кольцевой фильерой модели SJ-28 (Китай). Полиэтилен и наполнители подвергали предварительному смешению с грануляцией на базе

НПФ «БАРС-2/Баско», в результате чего получали суперконцентрат для дальнейшей экструзии.

Санитарно-химические исследования полученных образцов наполненных пленок проводили в соответствии с требованиями ТРТС 005/2011 на модельных средах. Органолептическую оценку исследованных образцов высоконаполненных минеральными компонентами пленок проводили в соответствии с требованиями инструкции Министерства здравоохранения МИ 880–71.

Исследования миграции летучих органических соединений проводили в соответствии с ГОСТ 34174–2017 на газовом хроматографе Кристаллюкс 4000М. Для определения содержания металлов в вытяжках из образцов применяли спектрометр эмиссионный с индуктивно-связанной плазмой 5110 ICP-OES (страна изготовитель Малайзия, Agilent Technologies Bayan Lepas Free), который регистрирует электромагнитное излучение зафиксированного в момент перехода частиц с уровня высоких энергий на низшие.

Метод определения формальдегида основан на его реакции с хромотроповой кислотой РД 52.54.492–2006 «Массовая концентрация формальдегида в водах. Методика выполнения измерений фотометрическим методом с ацетил ацетоном»

Оборудование и процедура исследования

Для реализации методологии совмещения компонентов в расплаве в процессе высокотемпературной экструзии, использовали предварительную операцию подготовки суперконцентрата. Такой технологический прием позволяет получать лучшее распределение наполнителей в массе полимера.

В работе для лучшего смешивания применяли суперконцентрат. Из-за высокой температуры плавления ДКВ по сравнению с ПЭВД в состав композиции вводили термостабилизаторы (Ирганокс 0,1 %, Иргафокс 0,4 % и стearат кальция 0,5 %). Производство суперконцентрата осуществлялось на специализированном оборудовании немецкого производства. Использовался экструдер, имеющий 10 зон обогрева. Согласно технологии, стренги принимались в воду, после охлаждения осуществлялась их грануляция и сушка. Смешение полиэтилена с суперконцентратом осуществляли механически методом «пьяной бочки». Выработку опытных образцов пленки осуществляли с использованием лабораторного экструдера

Д. М. Мясенко, О. Б. Федотова, А. А. Агарков, С. С. Сиротин

дера при следующих температурных режимах экструзии по зонам экструдера: 145–150–153–157 °C.

Санитарно-гигиенические исследования проводили последовательно двумя базовыми этапами: органолептическая оценка водных вытяжек и санитарно-химические исследования, определяющие возможную миграцию нежелательных веществ из пленки в модельные среды. Из полученных образцов пленки на лабораторной сварочной машине формировали пакеты, размером 150 × 150 мм, в которые заливали модельные среды объемом 300 мл. После внесения раствора пакеты были герметично запаены и оставлены на экспозицию в нерегулируемых условиях при комнатной температуре.

В основу метода органолептической оценки положен метод комиссионной закрытой дегустации расширенного треугольника. Оценка полученных данных проводится по интенсивности запаха водных вытяжек по пятибалльной шкале. Для оценки запаха, привкуса, цвета, мути и прозрачности модельной среды, в которой в течение 10 суток выдерживали опытные образцы пленок использовали дистиллированную воду. Органолептическую оценку водных вытяжек осуществляли при 20, 40 и 60 °C. В соответствии с МИ 880-71 «Если органолептические показатели превышают 1 балл, то исследуемый образец признается непригодным для использования в пищевой промышленности без дальнейших исследований. В случае отсутствия органолептических изменений проводят химическое исследование вытяжки.»

Исследования миграции летучих органических соединений проводили на трех модельных средах: раствор молочной кислоты 0,3%, раствор молочной кислоты 3,0% и дистиллированная вода. Образцы для проведения исследования находились на экспозиции в течение 10 суток, с последующим концентрированием паровой фазы в дозаторе равновесного пара ДРП-10. Объем анализируемой пробы 8 мл.

Продукт окисления полиэтилена — формальдегид, определяли следующим образом: Проведение испытания: 200 мл вытяжки помещают в систему для отгона и перегоняют 25 мл пробы. Затем в колбу с отгоном добавляется 3 мл ацетатно-аммонийного буферного раствора (рН буфера от 5,9 до 6,2) и 1 мл 5,0% раствора ацетилаcetона. Колбу помещают в водяную баню на 30 минут при температуре 40 ± 3 °C. При охлаждении пробирки перемешивают ее содержимое и определяют оптическую плотность полученной пробы и по кали-

бровочному графику определяют концентрацию формальдегида в пробе.

Расчет концентрации формальдегида в модельных средах проводили по формуле:

$$X = \frac{100 \times q_0 \times b \times 1000}{V_a \times V_b},$$

где q_0 — содержание формальдегида в аликвоте отгона, найденное по градировочной зависимости, мг;
 b — коэффициент, учитывающий степень отгонки формальдегида;
 V_a — объем аликвоты отгона, см³ (равный 25);
 V_b — объем пробы воды, взятый для отгона, см³ (равный 200).

Все эксперименты проведены в 3–5 кратной повторности и статистически обработаны.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Органолептические исследования

В результате отработки технологии и варьирования содержания наполнителей в полиэтилене, получены образцы с содержанием CaCO₃ 20,0; 40,0; 50,0 и 70,0 масс %; с содержанием ДКВ 0,5 и 1,0 масс %, а также, образцы, одновременно содержащие CaCO₃ и ДКВ, масс % – 20,0 и 0,5; 40,0 и 0,5; 20,0 и 1,0; 40,0 и 1,0 соответственно.

Ширина рукава полученной пленки составила 175 ± 2 мм, толщина пленки 35 ± 3 мкм. Визуальное рассмотрение поверхности полученных образцов показало отсутствие непролагов и видимых дефектов. Поверхность пленок гладкая.

Водные вытяжки из полимерной наполненной пленки при всех температурах и сроках экспозиции не содержали мути или осадка и не изменили цвета. Для построения профилограмм (представленных на Рисунке 1) органолептической оценки водных вытяжек, и обсуждения результатов санитарно-химических исследований, использовано условное обозначение образцов (Таблица 1).

Представленные результаты свидетельствуют о том, что запах водных вытяжек всех образцов не превышает гигиенический норматив 1 балл, однако, при 60 °C уже наблюдаются критические значения показателя у трех образцов (№№8,10 и 11), содержащих ДКВ.

Д. М. Мяленко, О. Б. Федотова, А. А. Агарков, С. С. Сиротин

Таблица 1

Условное обозначение опытных образцов наполненной модифицированной полиэтиленовой пленки

№	Название
1	ПЭ
2	ПЭ + CaCO ₃ 20 %
3	ПЭ + CaCO ₃ 40 %
4	ПЭ + CaCO ₃ 50 %
5	ПЭ + CaCO ₃ 70 %
6	ПЭ + ДКВ 0,5 %
7	ПЭ + CaCO ₃ 20 % + ДКВ 0,5 %
8	ПЭ + CaCO ₃ 40 % + ДКВ 0,5 %
9	ПЭ + ДКВ 1 %
10	ПЭ + CaCO ₃ 20 % + ДКВ 1 %
11	ПЭ + CaCO ₃ 40 % + ДКВ 1,0 %

Рисунок 1

Результаты органолептической оценки водных вытяжек из опытных образцов при 20 °С (а); 40 °С (б); 60 °С (с)

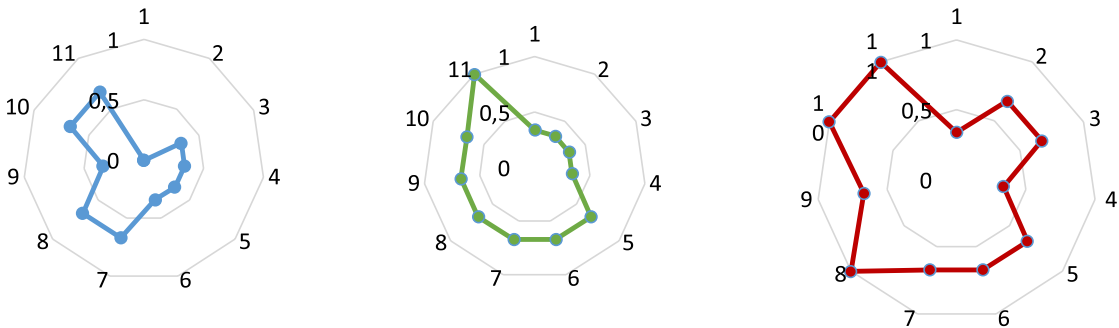


Таблица 2

Содержание формальдегида в вытяжках из опытных образцов в различные модельные среды

№	Модельная среда								
	Дистиллированная вода			Молочная кислота 0,3%			Молочная кислота 3,0%		
	D	q, мг	C, мг/дм³	D	q, мг	C, мг/дм³	D	q, мг	C, мг/дм³
1	0,0011	0,0008	0,0230	0,0029	0,0010	0,0250	0,0040	0,0008	0,0207
2	0,0009	0,0008	0,0225	0,0029	0,0010	0,0250	0,0040	0,0008	0,0207
3	0,0008	0,0008	0,0222	0,0028	0,0010	0,0247	0,0042	0,0009	0,0211
4	0,0010	0,0008	0,0227	0,0029	0,0010	0,0250	0,0042	0,0000	0,0211
5	0,0011	0,0008	0,0230	0,0027	0,0010	0,0247	0,0040	0,0008	0,0207
6	0,0012	0,0008	0,0233	0,0027	0,0010	0,0247	0,0045	0,0009	0,0218
7	0,0010	0,0008	0,0227	0,0028	0,0010	0,0248	0,0025	0,0007	0,0176
8	0,0011	0,0008	0,0230	0,0029	0,0010	0,0250	0,0018	0,0007	0,0161
9	0,0012	0,0008	0,0233	0,0025	0,0009	0,0241	0,0032	0,0008	0,0190
10	0,0012	0,0008	0,0233	0,0025	0,0009	0,0241	0,0036	0,0008	0,0199
11	0,0010	0,0008	0,0227	0,0029	0,0010	0,0250	0,0040	0,0008	0,0207

Исследование миграции формальдегида

Результаты определения формальдегида в модельных средах представлены в Таблице 2.

У всех образцов во всех модельных средах содержание формальдегида значительно ниже его ДКМ, составляющей 0,1 мг/л. Зависимости содержания следов формальдегида от состава наполнителя не обнаружено

Оценка миграции летучих органических соединений

Результаты определения летучих органических соединений из образцов приведены на Рисунках 2–4.

Рассмотрение полученных результатов свидетельствует о наличии неидентифицированных летучих соединений в исследованных образцах, однако, их суммарное количество мало и негативно не влияет на безопасность полученной упаковочной пленки. При этом, от-

Рисунок 2

Хроматограммы вытяжек из образцов полиэтиленовой пленки

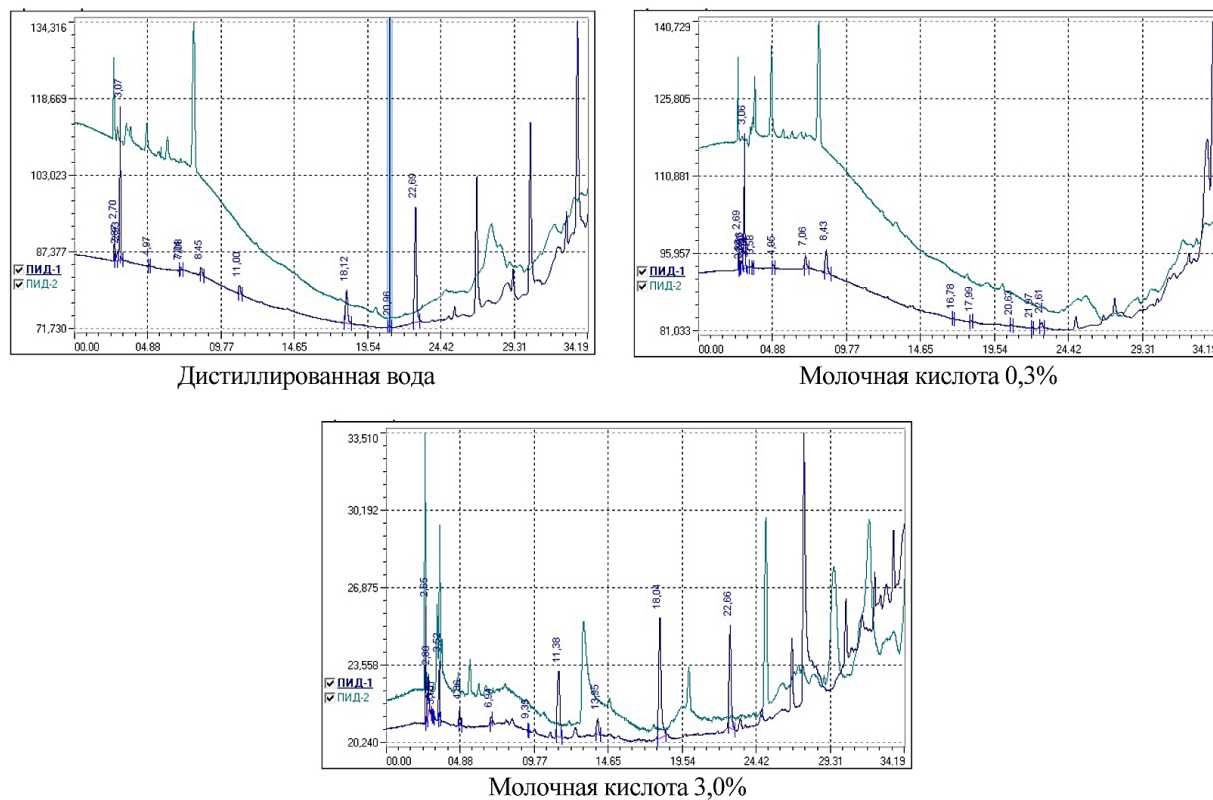
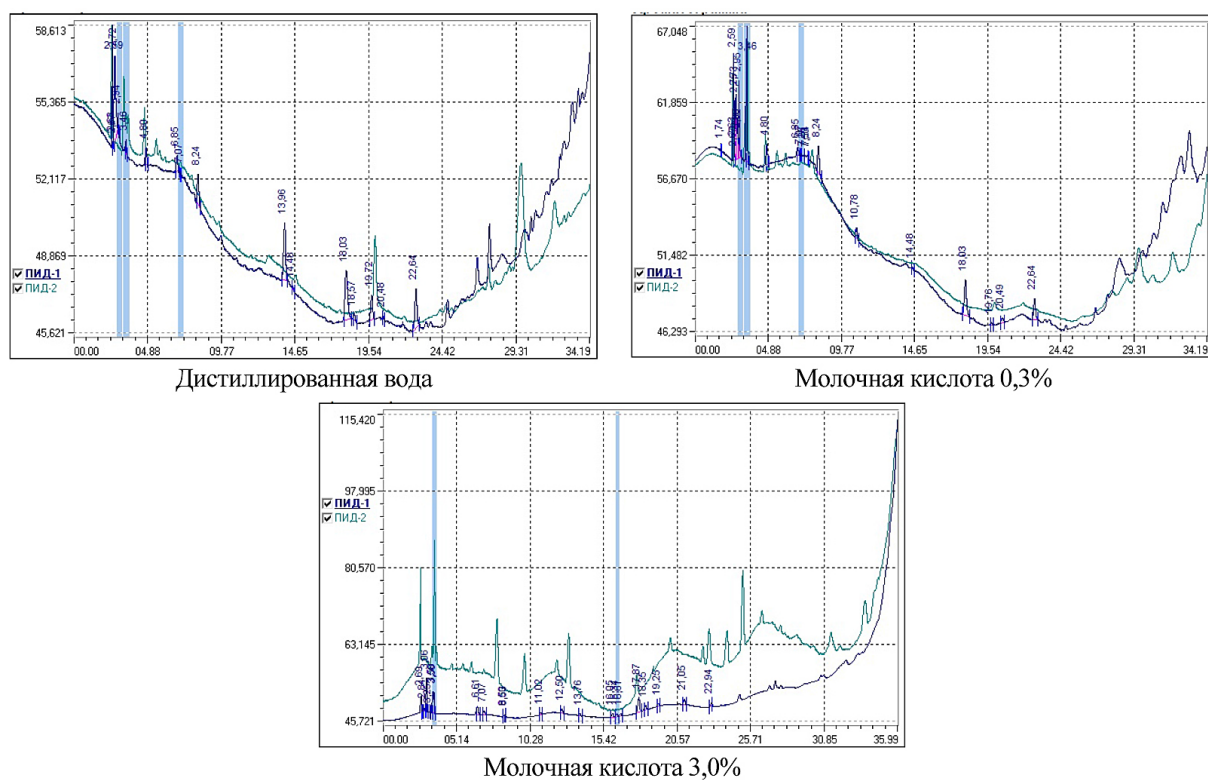


Рисунок 3

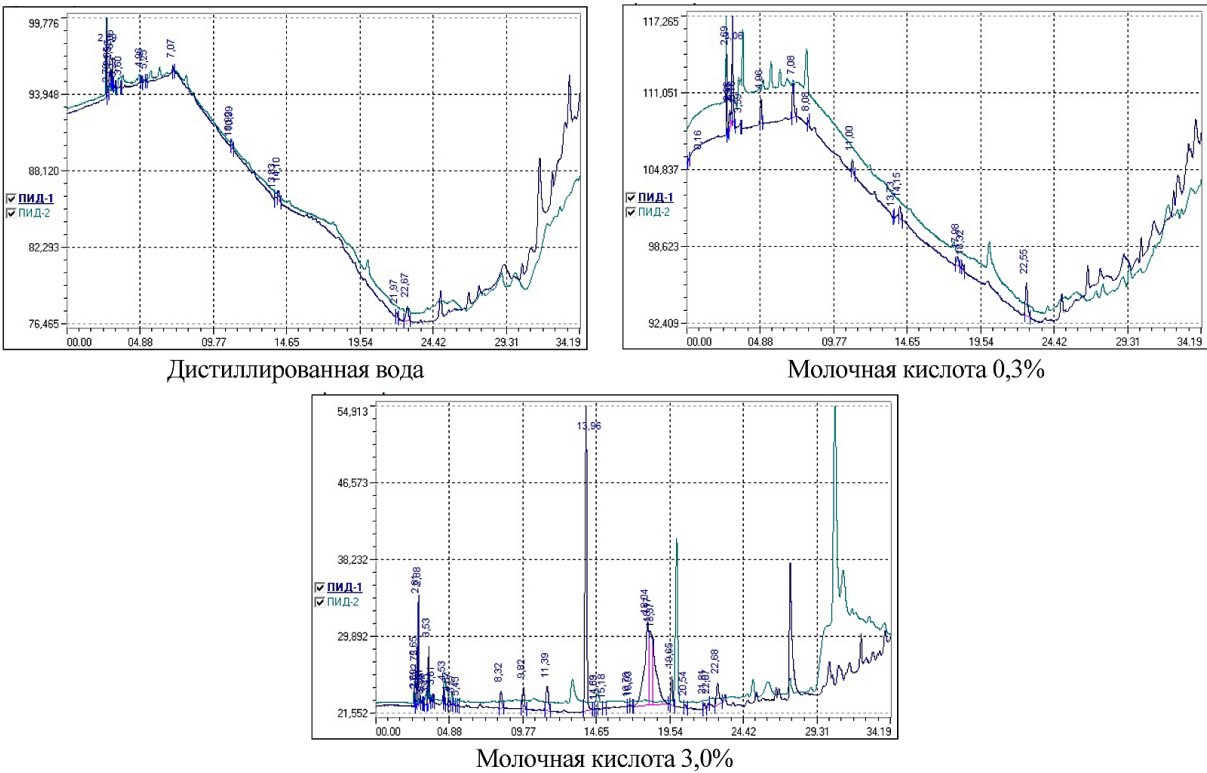
Хроматограммы вытяжек из образцов полиэтиленовой пленки модифицированной CaCO_3 с концентрацией 70,0 %



Д. М. Мяленко, О. Б. Федотова, А. А. Агарков, С. С. Сиротин

Рисунок 4

Хроматограммы вытяжек из образцов полиэтиленовой пленки модифицированной CaCO_3 с концентрацией 40,0 % и добавлением 1,0 % ДКВ



мечено, что характер пиков, их интенсивность и время удерживания зависит от вида образца и типа модельной среды. Полученные данные коррелируются с результатами органолептической оценки, показавшей отсутствие сверхнормативного запаха водных вытяжек.

Представляло интерес исследование миграции металлов, как возможных загрязнителей CaCO_3 и остатков ка-

тализаторов полимеризации полиэтилена. Результаты представлены в Таблице 3.

Полученные результаты свидетельствуют о практическом отсутствии миграции исследуемых металлов, в том числе, из пленок с максимальным введением карбоната кальция (70 %).

Таблица 3

Содержание алюминия, кадмия и свинца в вытяжках из пленки, наполненной CaCO_3 в различные модельные среды

№ образца	Модельная среда								
	Дистиллированная вода			Молочная кислота 0,3 %			Молочная кислота 3,0 %		
	AL, мг/дм ³	Zn, мг/дм ³	Cd, мг/дм ³	AL, мг/дм ³	Zn, мг/дм ³	Cd, мг/дм ³	AL, мг/дм ³	Zn, мг/дм ³	Cd, мг/дм ³
1	Менее 0,01	Менее 0,005	Менее 0,003	Менее 0,01	Менее 0,005	Менее 0,003	Менее 0,01	Менее 0,005	Менее 0,003
2	Менее 0,01	Менее 0,005	Менее 0,003	Менее 0,01	Менее 0,005	Менее 0,003	Менее 0,01	Менее 0,005	Менее 0,003
3	Менее 0,01	Менее 0,005	Менее 0,003	Менее 0,01	Менее 0,005	Менее 0,003	Менее 0,01	Менее 0,005	Менее 0,003
4	Менее 0,01	Менее 0,005	Менее 0,003	0,015	Менее 0,005	Менее 0,003	0,014	Менее 0,005	Менее 0,003
5	Менее 0,01	Менее 0,005	Менее 0,003	0,013	Менее 0,005	Менее 0,003	0,012	Менее 0,005	Менее 0,003

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Химические вещества, присутствующие в пластике, потенциально могут мигрировать из пластикового продукта в среду, контактирующую с продуктом, а также могут медленно мигрировать внутри пластика на поверхность. Nahladakis et al. (2018) установили, что добавки почти во всех случаях химически не связаны с пластиковым полимером. Только реактивные органические добавки, например, некоторые антипирены, полимеризуются с молекулами пластика и становятся частью полимерной цепи. Hansen, & Lassen (2013) продемонстрировали, что введение пластификаторов в концентрации 10,0–70,0% и термостабилизаторов в концентрации 0,5–3,0% может приводить к потенциальным рискам миграции вредных веществ на основе фталатов, адипатов и других веществ (ссылка). Кроме того, использование стабилизаторов Иргард в концентрации до 3,0% может приводить к сверхнормативной миграции фенольных соединений в том числе бисфенола, а также тяжелых металлов (кадмия и свинца).

В данной работе для изготовления модифицированных пленок мы использовали термостабилизатор в концентрации 0,1% и 0,4%. Сравнение полученных нами результатов с результатами Nahladakis et al. (2018) и Hansen & Lassen (2013) позволяет констатировать, что введение добавки Иргард в выбранных нами соотношениях не приводит к увеличению сверхнормативной миграции летучих органических соединений.

Bhunja et al. (2013) всесторонне рассмотрели миграцию различных химических веществ из пластиковых упаковочных материалов при МВ и обычном нагреве при различных условиях хранения. Dorico-García et al. (2003) продемонстрировали, что при длительном хранении упаковочных материалов на основе полиэтилена в дистиллированную воду и масло мигрирует незначительное количество гептана и изопропилового спирта, а так же обнаруживаются следы термостабилизаторов Иргард и Этанокс. Проведенный нами анализ миграции летучих органических соединений на различных модельных средах не выявил сверхнормативной миграции нормируемых химических веществ для полиметиленовой модифицированной пленки. Это свидетельствует о том, что использование модификаторов и термостабилизаторов в выбранном диапазоне концентрации и температурных режимах не ухудшает

санитарно-гигиенические показатели разработанной нами полиэтиленовой пленки.

Результаты комплексных органолептических и санитарно-химических исследований образцов разработанной пленки полиэтиленовой с минеральным наполнителем, модифицированной антиоксидантной добавкой показали их полное соответствие требованиям по санитарной безопасности.

ВЫВОДЫ

Разработан упаковочный пленочный материал, наполненный карбонатом кальция и ДКВ, предназначенный для брикетирования сливочного масла, творога, творожных изделий. Отработаны концентрации наполнителей: CaCO_3 — в диапазоне от 20 до 70 масс %, ДКВ — 0,5 и 1,0%. Выбранные диапазоны обусловлены технологическими и экономическими особенностями производства наполненных пленок. Применен способ экструзии через кольцевую фильеру.

Проведенная органолептическая оценка образцов показала их соответствие предъявляемым требованиям, тем не менее, при температуре 60°C наблюдаются критические значения показателя у трех образцов, содержащих ДКВ, что свидетельствует о том, что использование модифицированной упаковки с данным компонентом ограничено его концентрацией в массе и температурой эксплуатации готовых упаковочных изделий.

Содержание формальдегида во всех исследованных образцах значительно ниже его ДКМ, однако, наличие следов вещества в водных вытяжках свидетельствует о слабом, но протекании процессов термоокислительной деструкции исследованных материалов.

Хроматографический анализ летучих соединений из образцов наполненных модифицированных пленок подтвердил наличие неидентифицированных летучих соединений в исследованных образцах, однако, их суммарное количество мало и негативно не влияет на безопасность полученной упаковочной пленки. При этом, отмечено, что характер пиков, их интенсивность и время удерживания зависит от вида образца и типа используемой модельной среды. Полученные данные коррелируются с результатами оценки запаха водных вытяжек из образцов.

Д. М. Мяленко, О. Б. Федотова, А. А. Агарков, С. С. Сиротин

Исследования показали отсутствие миграции металлов из образцов пленочного материала, наполненного карбонатом кальция.

В целом, проведенные комплексные органолептические и санитарно-химические исследования показали, что разработанные варианты наполненных модифицированных пленок соответствуют требованиям санитарно-гигиенической безопасности и пригодны для контакта с молочной продукцией. Полученные результаты свидетельствуют о существенных предпосылках для создания функциональных и модифицированных пленочных материалов, в том числе с комплексом антимикробных и антиоксидантных свойств.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Мяленко Д.М: формулирование идеи; формулирование исследовательских целей и задач; курирование данных, написание — подготовка черновика рукописи; подготовка и создание рукописи

Федотова О.Б: курирование данных, написание — подготовка черновика рукописи; подготовка и создание рукописи.

Агарков А.А: визуализация, проведение исследования; Проведение исследовательского процесса, в частности, проведение экспериментов и сбор данных.

Сиротин С.С: проведение исследовательского процесса, в частности, проведение экспериментов и сбор данных .

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Зобкова, З.С., Фирсова, Т.П., & Зенина, Д.В. (2018). Выбор белковых ингредиентов, обогащающих и модифицирующих структуру кисломолочных напитков. В *Актуальные вопросы индустрии напитков* (с. 64–69). М.: ВНИИПБиВП. <https://doi.org/10.21323/978-5-6041190-3-7-2018-2-64-69>
- Zobkova, Z. S., Fursova, T. P., & Zenina, D. V. (2018). Protein ingredients selection, enriching and modifying the oxidum drinks structure. In *Aktualnye Voprosy Industrii Napitkov* (pp. 64–69). Moscow: VNIIPVP. <https://doi.org/10.21323/978-5-6041190-3-7-2018-2-64-69>
- Зобкова, З.С. (2006). *Пороки молока и молочных продуктов. причины возникновения и меры предотвращения*. Москва.
- Zobkova, Z.S. (2006). *Defects of milk and dairy products: Causes and prevention measures*. Moscow. (In Russ.).
- Илларионова, Е. Е., Туровская, С. Н., & Радаева, И. А. (2020). К вопросу увеличения срока годности молочных продуктов. Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством: сборник научных трудов (вып. 1, с. 225–230). VNIIMI. <https://doi.org/10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-225-230>
- Illarionova, E. E., Turovskaya, S. N., & Radaeva, I. A. (2020). To the question of increasing of canned milk storage life. *Actual Issues of the Dairy Industry, Intersectoral Technologies and Quality Management Systems*, 225–230. (In Russ.). <https://doi.org/10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-225-230>
- Мяленко, Д. М., Федотова О.Б. (2022). Surface morphology of polyethylene film samples filled with titanium dioxide. *Food Processing Industry*, 3, 56–59. <https://doi.org/10.52653/PPI.2022.3.3.013>
- Mialenko, D.M., & Fedotova, O.B. (2022). Surface morphology of polyethylene film samples filled with titanium dioxide. *Food Processing Industry*, 3, 56–59. (In Russ.). <https://doi.org/10.52653/PPI.2022.3.3.013>
- Пряничникова Н.С. (2020а). Защитные покрытия для пищевых продуктов. *Современные Достижения биотехнологии. техника, технологии и упаковка для реализации инновационных проектов на предприятиях пищевой и биотехнологической промышленности. Материалы VII Международной научно-практической конференции* (с. 86–89). Пятигорск: Пятигорский филиал Северо-Кавказский федеральный университет.
- Pryanichnikova, N.S. (2020а). Protective coatings for food products. *Modern Achievements of Biotechnology: Techniques, Technologies, and Packaging for the Implementation of Innovative Projects in the Food and Biotechnology Industry. Materials of the VII International Scientific and Practical Conference* (pp. 86–89). Pyatigorsk: Pyatigorsk Branch of the North Caucasus Federal University. (In Russ.).
- Пряничникова Н.С. (2020b). Съедобная упаковка: транспорт для функциональных и биоактивных соединений. *Молочная река*, 4(80), 32–34.

- Pryanichnikova, N.S. (2020b). Edible packaging: carrier for functional and bioactive compounds. *Milk River*, 4(80), 32–34. (In Russ.).
- Розалёнок, Т.А. & Сидорин.Ю.Ю (2014). Исследование и разработка антимикробной композиции для пищевых упаковок. *Техника и технология пищевых производств*, 2(33).
- Rozalyonok, T.A., & Sidorin, Y.Y. (2014). Research and development of an antimicrobial composition for food packaging. *Food Processing Equipment and Technology*, 2(33). (In Russ.).
- Тимошков, П.Н., & Коган, Д. И. (2013). Современные технологии производства полимерных композиционных материалов нового поколения. *Труды ВИАМ*, (4), 1–21
- Timoshkov, P.N., & Kogan, D.I. (2013). Modern technologies for the production of next-generation polymer composite materials. *Proceedings of VIAM*, (4), 1–21. (In Russ.).
- Федотова, О. Б. (2008). *Упаковка для молока и молочных продуктов. Качество и безопасность*. М.: Издательство Россельхозакадемии.
- Fedotova, O.B. (2008). *Packaging for milk and dairy products. Quality and safety*. Moscow: Rosselkhozakademiya Publishing. (In Russ.).
- Федотова.О.Б., Мяленко Д.М., & Шалаева А.В. (2010). “Активная упаковка” из полимерных материалов. *Пищевая Промышленность*, 1, 22–23.
- Fedotova, O.B., Mialenko, D.M., & Shalaeva, A.V. (2010). “Active packaging” made of polymer materials. *Food Industry*, 1, 22–23. (In Russ.).
- Фильчакова С.А. (2008). Микробиологическая чистота упаковки для молочных продуктов. *Молочная промышленность*, 7, 44–46.
- Filchakova, S.A. (2008). Microbiological purity of packaging for dairy products. *Dairy Industry*, 7, 44–46. (In Russ.).
- Хатко, З.Н. & Аршинова, А. А. (2016). Полимерные композиции для пленок пищевого назначения (обзор). *Новые технологии*, (1), 1–6
- Khatko, Z.N., & Arshinova, A.A. (2016). Polymer compositions for food film (review). *New Technologies*, (1), 1–6. (In Russ.).
- Чеботарь, А.М., Бомина, О.В. Перегудов, М.Г., Снежко, А.Г., Кузнецова, Л.С., Кулаева, Г.В., Борисова, З.С., Донцова, Э.П. (1999). Пленки с антимикробными свойствами. *Сыроделие*, 3, 16–18.
- Chebotar, A.M., Bomina, O.V., Peregudov, M.G., Snezhko, A.G., Kuznetsova, L.S., Kulaeva, G.V., Borisova, Z.S., & Dontsova, E.P. (1999). Films with antimicrobial properties. *Cheese Making*, 3, 16–18. (In Russ.).
- Юрова Е.А. (2019). Оценка качества и хранимостпособности молочных продуктов функциональной направленности. *Milk Branch Magazine*, 10, 6–11. <https://doi.org/10.33465/2222-5455-2019-10-6-10>
- Yurova, E.A. (2019). Assessment of quality and shelf life of functional dairy products. *Milk Branch Magazine*, 10, 6–11. (In Russ.). <https://doi.org/10.33465/2222-5455-2019-10-6-10>
- Arif, H., Yasir, M., Ali, F., Nazir, A., Ali, A., Al Huwayz, M., Alwadai, N., & Iqbal, M. (2023). Photocatalytic degradation of atrazine and abamectin using Chenopodium album leaves extract mediated copper oxide nanoparticles. *Zeitschrift Für Physikalische Chemie*, 237(6), 689–705. <https://doi.org/10.1515/zpch-2023-0224>
- Bartczak, Z., Argon, A. ., Cohen, R. ., & Weinberg, M. (1999). Toughness mechanism in semi-crystalline polymer blends: II. High-density polyethylene toughened with calcium carbonate filler particles. *Polymer*, 40(9), 2347–2365. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(98\)00444-3](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00444-3)
- Bhunja, K., Sablani, S. S., Tang, J., & Rasco, B. (2013). Migration of chemical compounds from packaging polymers during microwave, conventional heat treatment, and storage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), 523–545. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12028>
- Boutillier, S., Casadella, V., & Laperche, B. (2021). Economy — Innovation economics and the dynamics of interactions. In *Innovation Economics, Engineering and Management Handbook 1* (pp. 1–23). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119832492.ch1>
- Dopico-García, M. S., López-Vilariño, J. M., & González-Rodríguez, M. V. (2003). Determination of antioxidant migration levels from low-density polyethylene films into food simulants. *Journal of Chromatography A*, 1018(1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.025>
- Fedotova, O. B., & Pryanichnikova, N. S. (2021). Research of the polyethylene packaging layer structure change in contact with a food product at exposure to ultraviolet radiation. *Food Systems*, 4(1), 56–61. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-1-56-61>
- Galotto, M. J., & Guarda, A. (2004). Suitability of alternative fatty food simulants to study the effect of thermal and microwave heating on overall migration of plastic packaging. *Packaging Technology and Science: An International Journal*, 17(4), 219–223. <https://doi.org/10.1002/pts.660>
- Hadal, R. S., & Misra, R. D. K. (2004). The influence of loading rate and concurrent microstructural evolution in micrometric talc- and wollastonite-reinforced high isotactic polypropylene composites. *Materials Science and Engineering: A*, 374(1–2), 374–389. <https://doi.org/10.1016/J.MSEA.2004.03.035>

Д. М. Мяленко, О. Б. Федотова, А. А. Азарков, С. С. Сиротин

- Hahladakis, J. N., Velis, C. A., Weber, R., Iacovidou, E., & Purnell, P. (2018). An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 179–199. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.014>
- Hansen, E., Nilsson, N. H., Lithner, D., & Lassen, C. (2013). *Hazardous substances in plastic materials*. Nordic Council of Ministers.
- Kirsh, I., Frolova, Y., Bannikova, O., Beznaeva, O., Tveritnikova, I., Myalenko, D., Romanova, V., & Zagrebina, D. (2020). Research of the influence of the ultrasonic treatment on the melts of the polymeric compositions for the creation of packaging materials with antimicrobial properties and biodegradability. *Polymers*, 12(2), 275. <https://doi.org/10.3390/POLYM12020275>
- Maurer, F. H. J., Kosfeld, R., & Uhlenbroich, T. (1985). Interfacial interaction in kaolin-filled polyethylene composites. *Colloid & Polymer Science*, 263(8), 624–630. <https://doi.org/10.1007/BF01419886>
- Nowaczyk, G., Głowinkowski, S., & Jurga, S. (2004). Rheological and NMR studies of polyethylene/calcium carbonate composites. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 25(1–3), 194–199. <https://doi.org/10.1016/J.SSNMR.2003.07.003>
- Rothon, R. N. (1999). Mineral fillers in thermoplastics: Filler manufacture and characterisation. *Advances in Polymer Science*, 139, 68–107. https://doi.org/10.1007/3-540-69220-7_2/COVER
- Thio, Y. S., Argon, A. S., Cohen, R. E., & Weinberg, M. (2002a). Toughening of isotactic polypropylene with CaCO_3 particles. *Polymer*, 43(13), 3661–3674. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00193-3](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00193-3)
- Thio, Y. S., Argon, A. S., Cohen, R. E., & Weinberg, M. (2002b). Toughening of isotactic polypropylene with CaCO_3 particles. *Polymer*, 43(13), 3661–3674. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00193-3](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00193-3)
- Tiemprateeb, S., Hemachandra, K., & Suwanprateeb, J. (2000). A comparison of degree of properties enhancement produced by thermal annealing between polyethylene and calcium carbonate–polyethylene composites. *Polymer Testing*, 19(3), 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(98\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(98)00099-3)

Фракционный состав и ксиланолитическая активность белков, продуцируемых бактериями, выделенными из лигноцеллюлозной биомассы

Л. С. Дышлюк, Е. В. Ульрих, С. В. Агафонова, О. В. Казимирченко

Калининградский
государственный технический
университет, г. Калининград,
Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: Исследование фракционного состава и ксиланолитической активности белков, продуцируемых микроорганизмами из лигноцеллюлозного сырья, важно для разработки новых биотехнологических методов переработки растительных отходов в ценные биоактивные вещества, такие как ксилоолигосахариды. Эти вещества могут быть использованы для улучшения пищевых продуктов и создания нутрицевтиков, обладающих пребиотическими свойствами.

Цель: Оценка фракционного состава и ксиланолитической активности белков, продуцируемых бактериями из семян люпина белого с целью идентификации и характеристики энзимов, способных эффективно разлагать ксилан. Это позволяет разрабатывать новые подходы к использованию лигноцеллюлозного сырья для производства биопродуктов, в том числе пребиотиков, что может способствовать улучшению питания и здоровья, а также устойчивому управлению агропромышленными отходами.

Материалы и методы: В качестве исследуемых объектов выступали белковые фракции, изолированные из культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium*. Для десалинизации белкового осадка использовали метод диализа. Процесс выделения белков и их фракционирование проводили с использованием препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Молекулярные массы белковых фракций определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Ферментативно активные белки высушивали методом сублимации и оценивали их ксиланолитическую активность с использованием спектрофотометрического метода, основанного на определении редуцирующих сахаров, возникающих при действии фермента ксиланазы на β -1,4-связи ксилана. Экспериментальные данные подвергали статистической обработке с применением дисперсионного анализа (ANOVA).

Результаты: Из культуральной жидкости бактерий *Bacillus* были выделены четыре белковые фракции с молекулярными массами от 35,60 до 246,10 кДа. Наибольшее количество белков с молекулярной массой 242,30 кДа, 83,70 кДа и 35,90 кДа было обнаружено во фракции №1. Фракция №2 преобладала белками молекулярной массой 51,50 кДа и 42,70 кДа. В фракции №3 было выявлено большое разнообразие молекулярных масс, а фракция №4 содержала белки с молекулярными массами от 61,80 до 69,30 кДа. Белки с молекулярными массами от 35,60 до 41,00 кДа обладали ксиланолитической активностью на уровне 107,33 ед/г.

Выводы: Разработан метод выделения белков с ксиланолитической активностью из культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium*, изолированных из семян белого люпина (*Lupinus albus*). Полученные ферменты могут быть применены для переработки агропромышленных отходов с целью получения ксилоолигосахаридов.

Ключевые слова: пребиотики, ксиланолитические ферменты, микроорганизмы-продуценты, лигноцеллюлозная биомасса, фракционный состав, молекулярная масса

Корреспонденция:

Ульрих Елена Викторовна,
E-mail: elen.ulrich@mail.ru

Конфликт интересов:

авторы сообщают
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 01.11.2023

Принята: 15.03.2023

Опубликована: 30.03.2023

Финансирование

Статья выполнена
при финансовой поддержке
гранта РНФ, соглашение
№ 23-26-00091.

Copyright: © 2024 Авторы



Для цитирования: Дышлюк, Л. С., Ульрих, Е. В., Агафонова, С. В., & Казимирченко, О. В. (2024). Изучение фракционного состава и ксиланолитической активности белков, продуцируемых бактериями, выделенными из лигноцеллюлозной биомассы. *FOOD METAENGINEERING*, 2(1), 23-33. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.1.36>

Fractional Composition and Xylanolytic Activity of Proteins Produced by Bacteria Isolated from Lignocellulosic Biomass

Lyubov S. Dyshlyuk, Elena V. Ulrikh, Svetlana V. Agafonova, Oksana V. Kazimirchenko

Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: Research on the fractionation and xylanolytic activity of proteins produced by microorganisms from lignocellulosic raw materials is crucial for developing new biotechnological methods to convert plant waste into valuable bioactive substances, such as xylooligosaccharides. These substances can be used to enhance food products and create nutraceuticals with prebiotic properties.

Purpose: To assess the fractional composition and xylanolytic activity of proteins produced by bacteria from white lupin seeds to identify and characterize enzymes capable of efficiently degrading xylan. This allows for the development of new approaches to using lignocellulosic raw materials for bioproduct production, including prebiotics, which can improve nutrition and health and facilitate sustainable management of agro-industrial waste.

Materials and Methods: The study objects were protein fractions isolated from the culture fluid of *Bacillus megaterium* bacteria. Desalination of the protein precipitate was performed using dialysis. The extraction of proteins and their fractionation were conducted using preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). The molecular masses of the protein fractions were determined using polyacrylamide gel electrophoresis. Enzymatically active proteins were dried by lyophilization and their xylanolytic activity was assessed using a spectrophotometric method based on the quantification of reducing sugars formed when the enzyme xylanase acts on β -1,4 bonds of xylan. Experimental data were subjected to statistical analysis using analysis of variance (ANOVA).

Results: Four protein fractions with molecular masses ranging from 35.60 to 246.10 kDa were isolated from the bacterial culture fluid of *Bacillus*. The highest concentration of proteins with molecular masses of 242.30 kDa, 83.70 kDa, and 35.90 kDa was found in fraction #1. Fraction #2 was dominated by proteins with molecular masses of 51.50 kDa and 42.70 kDa. A wide variety of molecular masses was observed in fraction #3, and fraction #4 contained proteins with molecular masses ranging from 61.80 to 69.30 kDa. Proteins with molecular masses from 35.60 to 41.00 kDa exhibited xylanolytic activity at a level of 107.33 units/g.

Conclusion: A method for isolating proteins with xylanolytic activity from the culture fluid of *Bacillus megaterium* bacteria isolated from white lupin seeds (*Lupinus albus*) has been developed. The enzymes obtained can be used for the processing of agro-industrial waste to produce xylooligosaccharides.

Keywords: prebiotics, xylanolytic enzymes, producer microorganisms, lignocellulosic biomass, fractional composition, molecular mass

Correspondence:

Elena Victorovna Ulrikh
E-mail: elen.ulrich@mail.ru

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 01.11.2023

Accepted: 15.03.2024

Published: 30.03.2024

Funding

The article was carried out with the financial support of the RGNF grant, agreement No. 23-26-00091.

Copyright: © 2024 The Authors



To cite: Dyshlyuk, L. S., Ulrikh, E. V., Agafonova, S. V., & Kazimirchenko, O. V. (2024). Study of the fractional composition and xylanolytic activity of proteins produced by bacteria isolated from lignocellulosic biomass. *FOOD METAENGINEERING*, 2(1), 22-33. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.1.36>

ВВЕДЕНИЕ

Производство натуральных биоактивных соединений обрело статус ведущего направления в пищевой и нутрицевтической индустрии, что обусловлено многообразием их химической структуры, функциональными свойствами, а также подтвержденным положительным воздействием на состояние здоровья и благополучие человека¹ (Rechalla, 2017). Среди широко исследованных и активно используемых биоактивных соединений выделяются фенольные вещества, витамины, натуральные пигменты, жирные кислоты, биоактивные пептиды, пребиотические ингредиенты и прочие, присутствующие в разнообразных пищевых матрицах и производимые микроорганизмами (Chai, 2018; Sarwar, 2019; Wang, 2020).

Среди углеводов с пребиотическим действием ксило-олигосахариды (XOS) представляют особый интерес в связи с их физико-химическими и физиологическими свойствами, полезными для здоровья человека и животных (Meyer, 2015; Gomes, 2019). XOS являются антибактериальными веществами против нескольких желудочно-кишечных расстройств (Liao, 2019). Их употребление повышает иммунитет (Chen, 2012), модулирует микробиоту кишечника (Lin, 2016) и снижает риск развития рака (Maeda, 2012). XOS устойчивы к температурным воздействиям (от 0 до 60 °C) и кислотности (pH=3,5–7,5) (Zhao, 2021).

XOS в промышленном масштабе могут быть получены ферментативным гидролизом ксилана — одного из важных и распространенных компонентов клеточной стенки растений (Arruda, 2017; Borewicz, 2019). Расщепление ксилана происходит полиферментными системами, включающими эндо-1,4-β-ксиланазу, β-ксилозидазу, β-глюкуронидазу, β-арабинофуранозидазу и β-эстеразу.

Бифидо- и лактобактерии в толстом кишечнике человека секретируют гидролитические ферменты, расщепляющие XOS, до моносахаров, которые утилизируются в процессе роста и развития микроорганизмов, при этом выделяется энергия, необходимая для их размножения и роста (Alizadeh, 2019), а также образуются метаболиты (органические кислоты) и короткоцепочечные жирные кислоты, способствующие сокращению популяции патогенной микрофлоры (Artiga-Artigas, 2019). Известны исследования их антипатогенного и ан-

тиканцерогенного воздействий, позволяющих снизить уровень риска заболеваний кишечника (Gibson, 2017, Scott, 2020).

В связи с многообразием строения и функций ксилан-деградирующих ферментов возникает необходимость фракционирования белков, выделенных из микроорганизмов — потенциальных продуцентов ксиланаз, и исследования их свойств (Neri-Numa, 2020, Калинина, 2017).

Целью текущего исследования являлась оценка фракционного состава и ксиланолитической активности белков, продуцируемых бактериями, выделенными из лигноцеллюлозного сырья Калининградской области — семян люпина белого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объектами исследования являлись: культуральная жидкость бактерий *Bacillus megaterium*, выделенных из семян люпина белого (*Lupinus albus*, сорт «Дега»); белковые фракции, выделенные из культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium*.

Оборудование

Для проведения исследований использовано научное оборудование: термостат суховоздушный ТВ-80 по ТУ 9452–029–41457390–2006 (Касимовский приборный завод, Россия, год производства 2022), микроскоп биологический Биолаб для лабораторной диагностики *in vitro* (Nigbo Teaching Instrument Co Ltd, Китай, 2022 г.), центрифуга Eppendorf 5810 (Eppendorf, Германия, 2019 г.), УЗ диспергатор Soniprep-150 plus MSE (Soniprep, Великобритания, 2018 г.), хроматограф BIORAD NGC (Bio-Rad Laboratories, США, 2018 г.), прибор для электрофореза PowerPac (Bio-Rad Laboratories, США, 2017 г.), гель-документирующая система Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad Laboratories, США, 2018 г.), сублимационная установка Labconco (Labconco, США, 2018 г.), спектрофотометр УФ-1200 (Shanghai Mapada Instruments Co., Ltd., Китай, 2021 г.).

¹ Watson (2019). Prebiotic ingredients market to reach usd 11.48 billion by 2028. <https://www.reportsanddata.com/press-release/global-prebiotic-ingredients-market>

Методы

Выделение бактерий *Bacillus megaterium* из лигноцеллюлозного сырья и получение культуральной жидкости

Бактерии изолировали из семян люпина белого, для чего использовали метод десятикратных разведений проб в стерильном физиологическом растворе, исходная навеска семян составила 10 г. Из разведений осуществляли высев по 1 см³ суспензии в стерильные чашки Петри, после чего чашки заливали рыбопептонным агаром, содержащим ксилан (из расчета 2,5 г порошка ксилана на 1 литр питательной среды). Культивирование посевов вели при температуре 30 °С в течение 72 ч. Идентификацию штамма бактерий проводили по совокупности культуральных, морфологических, тинкториальных и физиолого-биохимических признаков (Дышлюк, 2023).

Подготовка культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium* для определения ксиланолитической активности

Образцы суточной культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium*, выращенных в рыбопептонном бульоне с добавлением ксилана, центрифугировали при скорости вращения ротора 5000 g. Собирали клеточную массу, которую растворяли в 10 см³ фосфатного буфера (рН = 7,4) и гомогенизировали на УЗ диспергаторе. Процесс измельчения проводили не менее трех раз. Суспензию центрифугировали при скорости вращения ротора 5000 g и собирали супернатант, в котором определяли ксиланолитическую активность по ГОСТ 31488–2012.

Выделение белков из культуральной жидкости и их фракционирование

Для выделения белков из культуральной жидкости бактерий использовали супернатант, полученный при центрифугировании суспензии бактерий, из которого осаждали белки методом высаливания до 80 % насыщения раствора сернокислого аммония. Процесс осаждения белковых фракций сульфатом аммония вели в течение 24 ч при температуре плюс 5 °С.

Полученный белковый осадок отделяли от раствора центрифугированием и обессоливали с помощью диализа (MW 3500 Да) в течение 24 ч против раствора фосфатного буфера (рН=7,4). Очищенный белковый

раствор фракционировали с помощью препаративного хроматографа. Колонка была заполнена сорбентом Biogel для эксклюзионной хроматографии. Элюент для фракционирования — фосфатный буфер рН=7,4 + 1 % хлористый натрий, скорость потока 2 см³/мин. С целью выделения максимального количества фракций детектирование осуществляли при разных длинах волн: 215, 255 и 280 нм.

Определение молекулярной массы белков

Молекулярную массу белковых фракций устанавливали с использованием метода электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) согласно методу, описанному в (Matsumoto, 2019). Белковые полосы в полиакриламидном геле визуализировали окрашиванием Кумасси бриллиантовым синим R-250. После электрофореза гель замачивали в 50 мМ натрий-цитратном буфере (рН 4) и инкубировали в течение 30 мин при 45 °С для выявления ксиланазной активности. Затем гель окрашивали водным раствором конго красного (2 мг/см³) в течение 15 мин при комнатной температуре. Гель промывали 1М раствором хлористого натрия и переносили в 5 %-ный (по объему) раствор уксусной кислоты. Более подробный анализ электрофоретических диаграмм проводили с помощью гель-документирующей системы.

Сушка белковых фракций

Фракции, содержащие белки с ксиланолитической активностью, высушивали методом сублимации. Параметры сублимационного высушивания: температура на стадии досушки минус 20 °С; вакуум — 0,3 мбар, температура охладителя — минус 80 °С.

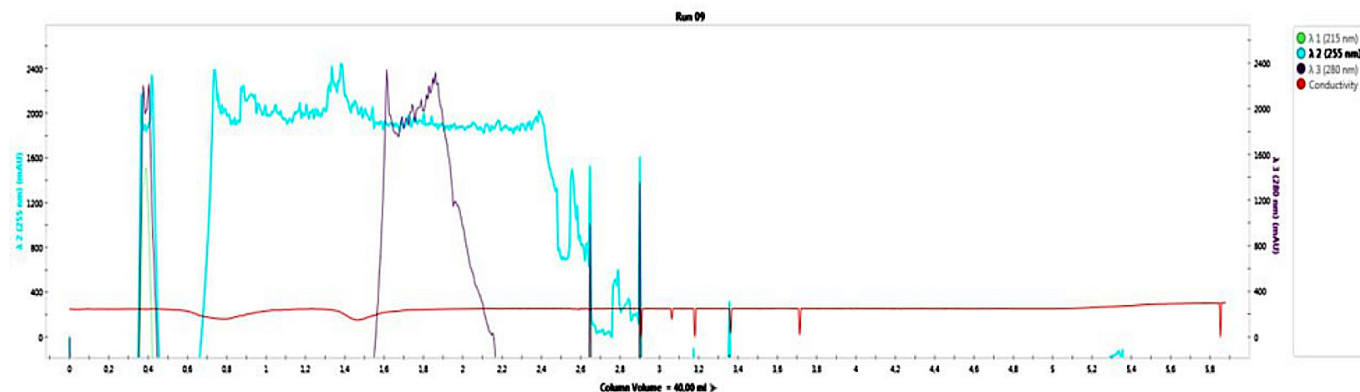
Определение ксиланолитической активности

Ксиланолитическую активность культуральной жидкости бактерий и белковых фракций, выделенных из неё методом хроматографии и высушенных методом сублимации, устанавливали в соответствии с ГОСТ 31488–2012. Метод основан на количественном определении редуцирующих сахаров, образующихся при действии фермента ксиланазы (экзоксиланазы) на β-1,4-связи ксилана при определении в стандартных условиях.

За единицу ферментативной активности ксиланазы (1 ед. КсА) принимали количество фермента, действующего на ксилан с высвобождением 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в пересчете на ксилозу) за 1 мин

Рисунок 1

Выделение фракций, содержащих белки



при стандартных условиях (температура 50 °С, значение pH 4,7, продолжительность гидролиза 10 мин). Содержание редуцирующих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяли колориметрическим методом с ДНС-реактивом (3,5-динитросалициловая кислота) при длине волны 540 нм и рассчитывали по градуировочному графику, построенному для ксилозы. Для измерения оптической плотности использовали спектрофотометр.

Анализ данных

Все эксперименты и вычисления проводились в трех повторностях. Результаты представляли как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Для обработки полученных данных использовали стандартные статистические методы. Данные подвергали дисперсионному анализу (ANOVA) с применением пакета Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2007, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

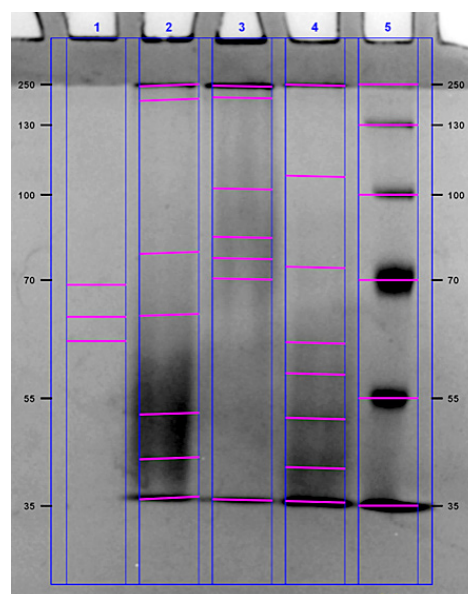
На первом этапе исследования применение трёхстадийной схемы, включающей осаждение сульфатом аммония, диализ и гель-фильтрационную хроматографию, для выделения и первичной очистки (от низкомолекулярных соединений) белков из культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium* (использовали накопительную культуру бактерии в объеме 200 см³) позволило выделить 4 белковые фракции с разным временем выхода из колонки, содержащие, в том числе, потенциальные ферменты ксиланолитического действия (Рисунок 1).

На следующем этапе оценивали степень чистоты выделенных фракций и молекулярную массу белков, предполагаемых ксиланолитических ферментов, используя метод электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Полученные результаты представлены на Рисунках 2–6.

Результаты, представленные на Рисунке 2, свидетельствуют о том, что на первом этапе получены фрак-

Рисунок 2

Белки культуральной жидкости *B. megaterium*, разделённые с помощью электрофореза в полиакриламидном геле



Примечание. 1 — фракция №4; 2 — фракция №2; 3 — фракция №1; 4 — фракция №3; 5 — смесь стандартных белков (белковый маркер)

Рисунок 3

Молекулярные массы белков, содержащихся во фракции №1

Lane 3

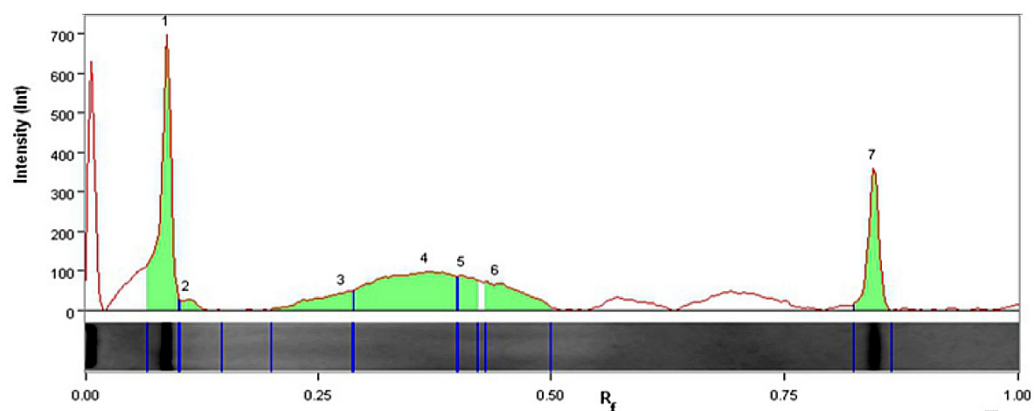


Рисунок 4

Молекулярные массы белков, содержащихся во фракции №2

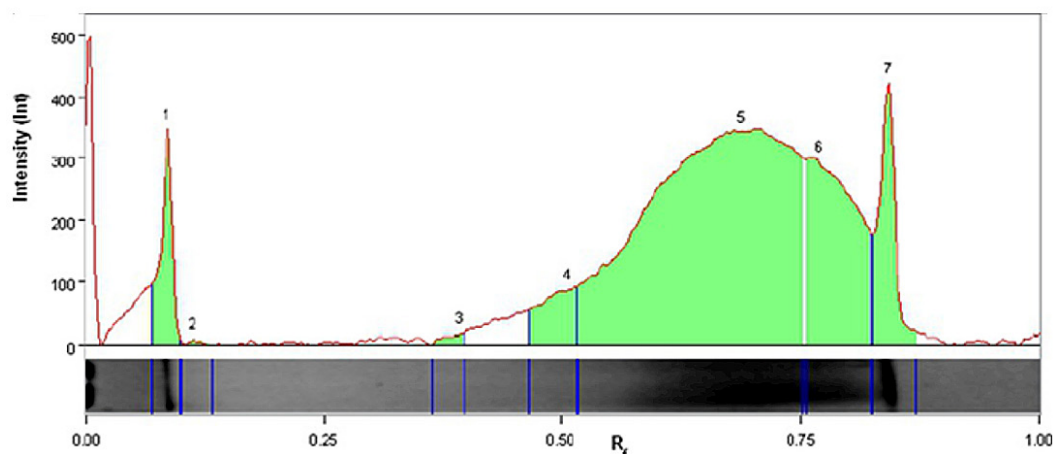
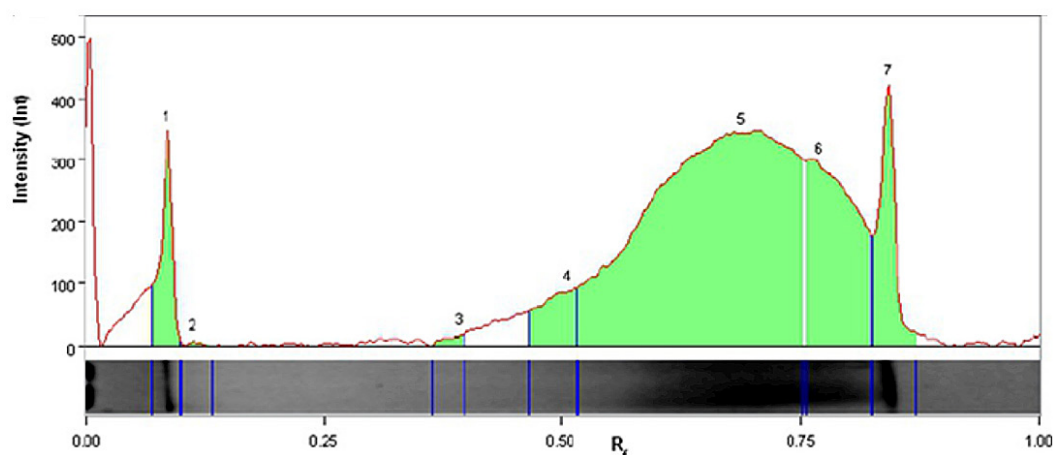


Рисунок 5

Молекулярные массы белков, содержащихся во фракции №3

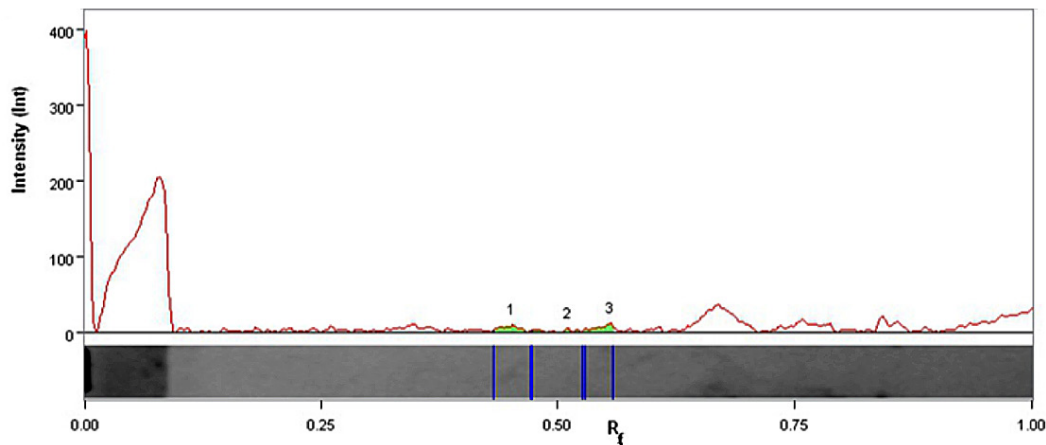


Л. С. Дышлок, Е. В. Ульрих, С. В. Агафонова, О. В. Казимирченко

Рисунок 6

Молекулярные массы белков, содержащихся во фракции №4

Lane 1



ции белков с различной молекулярной массой (от 35 до 250 кДа). Также установлено, что полученные фракции не содержат высокомолекулярных соединений не белковой природы.

Из результатов, представленных на Рисунках 2–6, следует, что фракция №4 показала три белковые полосы на SDS-PAGE, в остальных фракциях содержится большее количество индивидуальных белков с различной

молекулярной массой. Так, в дорожке геля, содержащего фракцию №2, обнаружено 7 отчетливых полос в различной области молекулярных масс, а в дорожках геля с фракциями №1 и №3–7 и 8 белков, соответственно.

Детальный анализ данных электрофореза (Рисунки 3–6, Таблица 1) позволил установить концентрации белков и их молекулярные массы.

Таблица 1

Характеристика белков, содержащихся в выделенных фракциях

Номер полосы	Молекулярная масса, кДа	Relative Front	Band, %	Lane, %
Фракция №1				
1	242,30	0,089	29,40	19,90
2	201,00	0,110	1,70	1,10
3	102,20	0,277	7,40	5,00
4	83,70	0,365	29,50	20,00
5	76,50	0,404	6,00	4,00
6	70,30	0,441	10,70	7,30
7	35,90	0,846	15,50	10,50
Фракция №2				
1	246,10	0,087	5,10	4,50
2	194,90	0,113	0,10	0,10
3	78,40	0,394	0,40	0,40
4	65,20	0,507	4,10	3,60
5	51,50	0,688	63,60	56,60
6	42,70	0,770	18,30	16,30
7	36,20	0,842	8,40	7,50

Окончание Таблицы 1

Номер полосы	Молекулярная масса, кДа	Relative Front	Band, %	Lane, %
Фракция №3				
1	246,10	0,087	25,70	19,20
2	107,20	0,254	0,20	0,10
3	73,80	0,420	0,90	0,70
4	61,60	0,559	8,60	6,40
5	57,80	0,615	6,30	4,70
6	50,50	0,697	6,60	4,90
7	41,00	0,787	16,50	12,30
8	35,60	0,849	35,10	26,20
Фракция №4				
1	69,30	0,453	42,10	1,30
2	64,90	0,511	16,80	0,50
3	61,80	0,555	41,10	1,20

Анализ эмпирических данных (Рисунки 3–6, Таблица 1) позволил установить, что фракция №1 содержит высокомолекулярные белки с молекулярной массой от 242,30 кДа (линия 1 на рисунке 2) до 83,0 кДа (линия 4). Также установлено, что в состав фракции входят белки с молекулярными массами 76,50 кДа (линия 5), 70,30 кДа (линия 6) и 35,90 кДа (линия 7). Показано, что во фракции №1 содержится наибольшее количество белков с молекулярной массой 242,30 кДа (линия 1), 83,70 кДа (линия 4) и 35,90 кДа (линия 7), на их долю приходится 29,40, 29,50 и 15,70 %, соответственно. Доля белков с молекулярной массой 76,50 кДа (линия 5) и 70,30 кДа (линия 6) составляет 6,00 и 70,70 %, соответственно. Отмечено низкое содержание высокомолекулярных белков (молекулярная масса 201,00 кДа и 102,20 кДа). На их долю в сумме приходится 9,10 %.

Выявлено, что во фракции №2 преобладают белки с молекулярной массой 51,50 кДа (содержание составило 63,60 %) и 42,70 кДа (содержание составило 18,30 %). Определено, что фракция №2 в своем составе содержит всего 5,10 % белка с молекулярной массой 246,10 кДа и 1,0 % белка с молекулярной массой 194,90 кДа. Содержание белка с молекулярными массами 78,40 и 65,20 кДа в анализируемом образце достигает 0,40 и 4,10 %, соответственно. В то же время, содержание низкомолекулярных белков во фракции №2 составило 18,30 % (белок с молекулярной массой 42,70 кДа) и 8,40 % (белок с молекулярной массой 36,20 кДа).

Установлено, что фракция №3 содержит большое количество белков с различной молекулярной массой. На долю белков с молекулярной массой 41,00 кДа (линия 7) и 35,60 кДа (линия 8) приходится 16,50 и 35,10 %, соответственно. Содержание белка с молекулярной массой 107,20 кДа (линия 2) и 73,80 кДа (линия 3) составляет 0,20 и 0,90 %, соответственно. Выявлено, что фракция №3 содержит до 8,60 % белка с молекулярной массой 61,60 кДа (линия 4), до 6,30 % белка с молекулярной массой 57,80 кДа (линия 5).

Показано, что содержание белка с молекулярной массой 50,50 кДа во фракции №3 составляет 6,60 %, что в 3,89 раз меньше содержания белка с молекулярной массой 246,10 кДа (линия 1).

Экспериментальные данные (таблица 1, рисунок 6) свидетельствуют о том, что фракция №4 содержит белки с молекулярной массой от 61,80 до 69,30 кДа, при этом на долю белков с молекулярными массами 69,30 кДа и 61,80 кДа приходится 42,10 и 41,10 %, соответственно. На долю белка с молекулярной массой 64,90 кДа (линия 2) приходится только 16,80 %.

Далее для четырёх выделенных и высушенных методом сублимации фракций устанавливали ксиланолитическую активность. Выявлено, что фракция №3 проявляет ксиланолитическую активность на уровне $507,33 \pm 15,22$ ед/г. Фракции №1, 2 и 4 не продемонстрировали ферментативной активности в отношении гидролиза ксилана.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты экспериментальных исследований подтвердили нашу гипотезу о наличии в белковых фракциях, выделенных из культуральной жидкости бактерий лигноцеллюлозного сырья, ферментов ксиланолитического действия. Наши результаты согласуются с данными Amir (2013), который показал, что ксиланолитические ферменты имеют низкую молекулярную массу. В частности, он выделил ксиланазу с молекулярной массой 43,0 кДа, которая соответствует диапазону молекулярных масс белков, выделенных из культуры *B. megaterium*, изолированных из семян люпина (35,6–246,1 кДа). Chen (1997) выделил из культурального фильтрата штамма *Trichoderma longibrachiatum* CS-185, выращенного на ксилане овсяной полбы, эндоксиланазу (1,4-β-d-ксилан-ксилангидролаза, КФ 3.2.1.8) с молекулярной массой 37,7 кДа. Эти данные находят подтверждение и в полученных нами результатах, согласно которым максимальную ксиланолитическую активность проявляют белки с молекулярной массой 35,60–41,00 кДа. Сравнивая результаты настоящего исследования и предыдущих исследований по теме, можно сделать вывод о схожести методов выделения белков из лигноцеллюлозного сырья и об их общей ксиланолитической активности.

Ratanakhanokchai и соавт. (1999) установили, что алкалофильная бактерия *Bacillus sp.* (штамм K-1) продуцирует внеклеточные ксиланолитические ферменты, такие как ксиланазы, β-ксилозидаза, арабинофуранозидаза и ацетилэстераза, при выращивании в ксилановой среде. Одну из внеклеточных ксиланаз очищали до гомогенности методом аффинной адсорбции-десорбции на нерастворимом ксилане. Фермент связывался с нерастворимым ксиланом, но не с кристаллической целлюлозой. Молекулярная масса ксилан-связывающей ксиланазы составила примерно 23 кДа. Эти данные свидетельствуют о преимуществе ВЭЖХ перед аффинной адсорбцией-десорбцией на нерастворимом ксилане. Метод аффинной адсорбции-десорбции не позволяет отделить родственные примеси от целевых ферментов, поэтому исследователи получили смеси нефракционированных белков, состоящих из ксиланазы, β-ксилозидазы, арабинофуранозидазы и ацетилэстеразы. Тем не менее, наша гипотеза о наличии ксиланолитических ферментов в белках, выделенных из культуры *B. megaterium* семян люпина, подтверждается, хотя минимальная молекулярная масса белков в нашем исследовании составля-

ет 35,60 кДа (согласно данным Ratanakhanokchai et al. (1999), 23,00 кДа).

Основываясь на данных о молекулярной массе выделенных белков и сопоставляя их с литературными данными (Chen, 1997; Ratanakhanokchai, 1999), авторы пришли к выводу, что фракции №1–3 содержат потенциальные ксиланолитические ферменты. Установлено, что фракция №1 содержит белок с молекулярной массой 35,90 кДа, а фракция №2 — белки с молекулярными массами 42,70 и 36,20 кДа, в которых ожидается наличие ксиланолитической активности. Во фракции №3 потенциальную ксиланазную активность могут иметь белки с молекулярной массой 41,00 кДа и 35,60 кДа. На данном этапе исследования ксиланолитическая активность экспериментально подтверждена только для фракции №3 ($107,33 \pm 5,15$ ед/г). Белковые фракции №1 и №2 не проявили ксиланолитической активности. Требуются дополнительные исследования, которые будут сосредоточены на предварительном выделении целевых белков с высокой степенью очистки с использованием гель-фильтрационной и анионообменной хроматографии (Lee, 2024) и последующей оценке их ферментативной активности в отношении гидролиза ксилансодержащих субстратов.

Ограничением предложенного метода выделения ксиланолитических ферментов из лигноцеллюлозного сырья является невысокая эффективность ферментативного гидролиза лигноцеллюлозы без предварительной обработки из-за ее высокой устойчивости к ферментативному воздействию. Для изменения ультраструктуры лигноцеллюлозы и ее кристалличности проводят предварительное измельчение сырья, а затем гидро-термальную, щелочную или кислотную обработку. Это позволяет извлекать гемицеллюлозы, особенно ксилан, и делает их более доступными для действия ксиланаз. Для оптимизации ферментативного разрушения ксилана необходим контроль pH, температуры и длительности воздействия ферментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана трёхстадийная схема выделения белков — потенциальных ксиланаз из культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium*, изолированных из семян люпина белого, включающая осаждение сульфатом аммония, диализ и гель-фильтрационную хроматографию. Выделены и высушены методом сублимации 4

Л. С. Дышлюк, Е. В. Ульрих, С. В. Агафонова, О. В. Казимирченко

белковые фракции с молекулярными массами в диапазоне от 35,6 до 246,1 кДа. При сопоставлении полученных результатов с данными литературы установлено, что ксиланолитическая активность ожидается у белков с молекулярными массами от 35,6 до 42,7 кДа. Целевые белки содержатся во фракциях №1, 2 и 3. Для фракции №3, содержащей белки с молекулярной массой от 35,6 до 246,1 кДа, установлена ксиланолитическая активность на уровне 107,33 ед/г. Фракции №1 и 2 не продемонстрировали ксиланолитической активности на данном этапе. Последующие исследования будут направлены на выделение целевых белков с высокой степенью очистки с помощью гель-фильтрационной и анионообменной хроматографии и оценку

их ферментативной активности в отношении гидролиза ксилансодержащих субстратов. Также будущие исследования по данной проблематике будут посвящены изучению физико-химических и биохимических свойств ферментов ксиланолитического действия, выделенных из культуральной жидкости бактерий *Bacillus megaterium*, с последующей разработкой научных основ и технологических приемов биотрансформации агропромышленных отходов с получением ксилоолигосахаридов для кормопроизводства. Оценка возможности использования полученных ферментов в пищевой промышленности будет осуществляться на основании результатов изучения безопасности штамма *Bacillus megaterium*.

ЛИТЕРАТУРА

- Дышлюк, Л.С., Казимирченко, О.В., Ульрих, Е.В., & Агафонова, С.В. (2023). Морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов — потенциальных продуцентов ксиланаз. *Вестник Международной академии холода*, 4, 79–90.
- Dyshlyuk, L.S., Kazimirchenko, O.V., Ulrikh, E.V., & Agafonova, S.V. (2023). Morphological, cultural, and physiolo-biochemical properties of microorganisms — potential producers of xylanases. *Bulletin of the International Academy of Cold*, 4, 79–90. (In Russ.).
- Калинина, А.Н., Борщевская, Л.Н., Гордеева, Т.Л., & Синеокий, С.П. (2017). Скрининг и таксономическая характеристика бактериальных продуцентов ксиланаз. *Биотехнология*, 33, 37–41. <https://dx.doi.org/10.21519/0234-2758-2017-33-6-37-41>
- Kalinina, A.N., Borshchevskaya, L.N., Gordeeva, T.L., & Sineokiy, S.P. (2017). Screening and taxonomic characteristics of bacterial xylanase producers. *Biotechnology*, 33, 37–41. (In Russ.). <https://dx.doi.org/10.21519/0234-2758-2017-33-6-37-41>
- Alizadeh, A., Oskuyi, A. S., & Amjadi, S. (2019). The optimization of prebiotic sucrose-free mango nectar by response surface methodology: the effect of stevia and inulin on physicochemical and rheological properties. *Food Science and Technology International*, 25, 243–251. <https://dx.doi.org/10.1177/1082013218818016>
- Amir, A., Arif, M., & Pande, V. (2013). Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus fumigatus* isolated from soil. *African Journal of Biotechnology*, 12, 3049–3057
- Arruda, H. S., Pereira, G. A., & Almeida, M. E. F. (2017). Current knowledge and future perspectives of oligosaccharides research. *Frontiers in Natural Product Chemistry*, 3, 91–175. <https://dx.doi.org/10.2174/9781681085340117030005>
- Artiga-Artigas, M., Odriozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., Martin-Belloso, O., Rubio, A. L., Rovira, M. J. F., & Sanz, M. M. (2019). Nanostructured systems to increase bioavailability of food ingredients. In L. G. Gomez-Mascaraque (Ed.), *Nanomaterials for food applications* (pp. 13–33). University of Lleida - Agrotecnio Center. <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00002-6>
- Borewicz, K., Suarez-Diez, M., Hechler, C., Beijers, R., de Weerth, C., Arts, I., Penders, J., Thijs, C., Nauta, A., Lindner, C., Van Leusen, E., Vaughan, E. E., & Smidt, H. (2019). The effect of prebiotic fortified infant formulas on microbiota composition and dynamics in early life. *Scientific Reports*, 9, Article 2434. <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-38268-x>
- Boucherba, N., Himed, L., Boussalah, N., & et Barkat, M. (2014). Purification and characterization of the xylanase produced by *Jonesia denitrificans* BN-13. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 2694–2705. <https://dx.doi.org/10.1007/s12010-013-0709-x>
- Chai, J., Jiang, P., Wang, P., Jiang, Y., Li, D., Bao, W., Liu, B., Zhao, L., Norde, W., Yuan, Q., Ren, F., & Li, Y. (2018). The intelligent delivery systems for bioactive compounds in foods: Physicochemical and physiological conditions, absorption mechanisms, obstacles and responsive strategies. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 144–154. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.003>
- Chen, C., Chen, J. L., & Lin, T. Y. (1997). Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production.

- Enzyme and Microbial Technology*, 21, 91–96. [https://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00236-0](https://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00236-0)
- Chen, H. H., Chen, Y. K., Chang, H. C., & Lin, S. Y. (2012). Immunomodulatory effects of xylooligosaccharides. *Food Science and Technology Research*, 18, 195–199. <https://dx.doi.org/10.3136/fstr.18.195>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14, 491–502. <https://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gomes, S., Finotelli, P. V., Sardela, V. F., Pereira, H., Santelli, R. E., Freire, A., & Torres, A. G. (2019). Microencapsulated Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) cake extract powder as an added-value functional food ingredient. *Food Science and Technology*, 116, Article 108495. <https://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108495>
- Lee, S., Jo, K., Jeong, S.-K.-C., Choi, Y.-S., & Jung, S. (2024). Production of freeze-dried beef powder for complementary food: Effect of temperature control in retaining protein digestibility. *Food Chemistry*, 433, 137419. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137419>
- Liao, N., Luo, B., Gao, J., Li, X., Zhao, Z., Zhang, Y., Ni, Y., & Tian, F. (2019). Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract. *Biotechnology Letters*, 41, 263–272. <https://dx.doi.org/10.1007/s10529-018-02634-6>
- Lin, S. H., Chou, L. M., Chien, Y. W., Chang, J.-S., & Lin, C.-I. (2016). Prebiotic effects of xylooligosaccharides on the improvement of microbiota balance in human subjects. *Gastroenterology Research and Practice*, Article ID 5789232. <https://dx.doi.org/10.1155/2016/5789232>
- Maeda, R., Ida, T., Ihara, H., & Sakamoto, T. (2012). Induction of apoptosis in MCF-7 cells by beta-1,3-xylooligosaccharides prepared from *Caulerpa lentillifera*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76, 1032–1034. <https://dx.doi.org/10.1271/bbb.120016>
- Matsumoto, H., Haniu, H., Komori, N. (2019). Determination of protein molecular weights on SDS-PAGE. In B. Kurien & R. Scofield (Eds.), *Electrophoretic Separation of Proteins. Methods in Molecular Biology* (vol. 1855). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_10
- Meyer, T. S. M., Miguel, A. S. M., Fernandez, D. E. R., & Ortiz, G. M. D. (2015). Biotechnological production of oligosaccharides — applications in the food industry. *Food Production and Industry*, 2, 25–78. <https://dx.doi.org/10.5772/60934>
- Neri-Numa, I. A., Arruda, H. S., Geraldi, M. V., Marostica, M. M., & Pastore, G. (2020). Natural prebiotic carbohydrates, carotenoids and flavonoids as ingredients in food systems. *Current Opinion in Food Science*, 33, 98–107. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.004>
- Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L., & Tanticharoen, M. (1999). Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 694–697. <https://dx.doi.org/10.1128/AEM.65.2.694-697.1999>
- Rechlarla, N., Riaz, M., Ko, S., & Park, S. (2017). Novel technologies to enhance solubility of food-derived bioactive compounds: A review. *Journal of Functional Foods*, 39, 63–73. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.001>
- Samanta, A., Chikkerur, J., Roy, S., Kolte, A., Sridhar, M., Dhali, A., Kandalam, G., & Senani, S. (2019). Xylooligosaccharides production from tobacco stalk xylan using edible acid. *Current Science*, 117, 1521–1525. <https://dx.doi.org/10.18520/cs/v117/i9/1521-1525>
- Sarwar, A., Aziz, T., Al-Dalali, S., Zhao, X., Zhang, J., ud Din, J., Chen, C., Cao, Y., & Yang, Z. (2019). Physicochemical and microbiological properties of synbiotic yogurt made with probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in combination with inulin. *Foods*, 8, 468. <https://dx.doi.org/10.3390/foods8100468>
- Scott, K. P., Grimaldi, R., Cunningham, M., Sarbini, S. R., Wijeyesekera, A., Tang, M. L. K., Lee, J. C.-Y., Yau, Y. F., Ansell, J., Theis, S., Yang, K., Menon, R., Arfsten, J., Manurung, S., Gourineni, V., & Gibson, G. R. (2019). Developments in understanding and applying prebiotics in research and practice—an ISAPP conference paper. *Journal of Applied Microbiology*, 128, 934–949. <https://dx.doi.org/10.1111/jam.14424>
- Wang, Y., Zheng, Z., Wang, K., Tang, C., Liu, Y., & Li, J. (2020). Prebiotic carbohydrates: effect on physicochemical stability and solubility of algal oil nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 228, Article 115372. <https://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115372>
- Zhao, J., Zhang, X., Zhou, X., & Xu, Y. (2021). Selective production of xylooligosaccharides by xylan hydrolysis using a novel recyclable and separable furoic acid. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 660266. <https://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2021.660266>

Применение методов *omics* в изучении эндофитных микроорганизмов: обзор предметного поля

А. Ю. Просеков

Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: Зерновые культуры являются основой продовольственной безопасности во многих регионах, в том числе в Кузбассе, но сталкиваются с угрозой снижения урожайности из-за биотических стрессов. Эффективным решением может стать использование эндофитных микроорганизмов, однако их взаимодействие с растениями еще недостаточно изучено. Omics-технологии предоставляют возможность детально изучить эти взаимоотношения, открывая путь к повышению продуктивности зерновых.

Цель: Обобщение и систематизация знаний об эндофитных микроорганизмах, полученных с применением omics-ных технологий.

Материалы и методы: Поиск производился в период с 4 по 18 декабря 2023 г в базах данных Scopus, ScienceDirect, GoogleScholar, по ключевым словам, endophytes, endosphere, RNA, transcriptome, genes, wheat, barley, oats. Поиск не ограничивали по временному периоду. Из 239 релевантных с точки зрения ключевых слов публикаций, 62 соответствовали критериям включения. Обзор предметного поля опирается на протокол PRISMA-ScR.

Результаты: В результате поиска обнаружено 62 источника, посвященных изучению эндофитного поведения с применением современных молекулярно-генетических методов исследования. Проведенный анализ позволил выявить следующие тренды применения эндофитных микроорганизмов: разработка микробных биостимуляторов сельскохозяйственных культур; применение в качестве агентов биологического контроля инфекционных заболеваний растений. Выявленные тренды согласуются с предыдущими обзорами данной предметной области. В отличие от ранних исследований, акцент смещен на реализацию генетического потенциала микробиоты, рассматриваются возможности модернизации генетической информации микроорганизмов.

Выводы: Необходимо развитие сферы применения молекулярно-генетических методов для изучения эндофитных микроорганизмов, так как их применение в качестве биоконтроля может стать многообещающей стратегией устойчивого развития агропромышленного комплекса. Особенный акцент необходимо сделать на изучение взаимосвязи данных микроорганизмов и зерновых культур, так как на данный момент сведений в современной научной литературе недостаточно.

Ключевые слова: эндофитные микроорганизмы; omics-технологии; агенты биоконтроля; молекулярно-генетические методы; зерновые культуры; микробные биостимуляторы; устойчивое сельское хозяйство

Корреспонденция:
Александр Юрьевич Просеков.
E-mail: rector@kemsu.ru

Конфликт интересов:
авторы сообщают
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 11.11.2023
Принята: 15.03.2023
Опубликована: 30.03.2023

Copyright: © 2024 Автор



Для цитирования: Просеков, А. Ю. (2024). Применение методов omics в изучении эндофитных микроорганизмов: обзор предметного поля. *FOOD METAENGINEERING*, 2(1), 34-50. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.1.44>

Application of Omics Methods in the Study of Endophytic Microorganisms: A Scoping Review

Alexander Yu. Prosekov

Kemerovo State University,
Kemerovo, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: Cereal crops are the basis of food security in many regions, including Kuzbass, but they face the threat of yield decline due to biotic stresses. The use of endophytic microorganisms could be an effective solution, but their interactions with plants are still not well understood. Omics technologies offer the opportunity to study these interactions in detail, paving the way to increasing cereal productivity.

Purpose: To summarize and systematize knowledge about endophytic microorganisms obtained using omics technologies.

Materials and Methods: The search was conducted from December 4 to December 18, 2023, in the Scopus, ScienceDirect, and Google Scholar databases using keywords such as endophytes, endosphere, RNA, transcriptome, genes, wheat, barley, and oats. The search was not limited by time period. Of the 239 publications relevant to the keywords, 62 met the inclusion criteria. The overview of the field is based on the PRISMA-ScR protocol.

Results: The search found 62 sources focused on studying endophytic behavior using modern molecular-genetic research methods. The analysis revealed the following trends in the application of endophytic microorganisms: the development of microbial biostimulants for agricultural crops and their use as agents for biological control of plant diseases. The identified trends are consistent with previous reviews in this field. Unlike early studies, the focus has shifted to the implementation of the genetic potential of the microbiota, exploring the possibilities of upgrading the genetic information of microorganisms.

Conclusion: It is necessary to develop the application of molecular-genetic methods for studying endophytic microorganisms, as their use as biocontrol agents can be a promising strategy for the sustainable development of the agro-industrial complex. Special emphasis should be placed on studying the relationship between these microorganisms and cereal crops, as there is currently insufficient information on this in the modern scientific literature.

Keywords: endophytic microorganisms; omics technologies; biocontrol agents; molecular-genetic methods; cereal crops; microbial biostimulants; sustainable agriculture

Correspondence:

Alexander Yurievich Prosekov
E-mail: rector@kemsu.ru

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 11.11.2023

Accepted: 15.03.2023

Published: 30.03.2023

Copyright: © 2024 The Author



To cite: Prosekov A.Yu. Application of omics methods to the study of endophytic microorganisms: Scoping Review. *FOOD METAENGINEERING*, 2(1), 34-50. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.1.44>

ВВЕДЕНИЕ

Продукты сельскохозяйственного производства, включая зерновые культуры, играют важную роль в обеспечении продовольственной безопасности. По данным FAO около 45 % энергии человек получает от злаков, корнеплодов и клубнеплодов¹. В Кемеровской области-Кузбассе зерновые и зернобобовые культуры также составляют значительную долю в питании населения и активно выращиваются. По данным за 2023 г занятые ими посевные площади составили 342 494,0 гектаров (63 % от всех посевных площадей)².

В 2023 году валовой сбор зерновых и зернобобовых составил 11391,8 тыс. центнеров (для всех категорий хозяйств). При этом урожайность составила 18,6 ц с 1 га убранной площади³. В период с 2018 по 2022 год наблюдалось значительное увеличение валового сбора зерна (Рисунок 1).

Наиболее распространенными зерновыми культурами в Кузбассе являются: пшеница, рожь озимая, ячмень и овес. Процентное распределение производства культур приведено на Рисунке 2. При этом продуктивность зерновых культур значительно снижается под воздействием фитопатогенов. В годы с острой эпидемиологической обстановкой потери пшеницы составляют от 50 до 60 % (Figueroa et al., 2018).

В современном мире наблюдается тенденция к росту заболеваемости сельскохозяйственных культур. Некоторые исследования свидетельствуют о том, что это может быть связано с повышением среднесуточных температур, которое происходит ежегодно и провоцирует смещение вегетационного периода растений и изменение его продолжительности. Так, у растений, подвергшихся воздействию высоких температур в ночное время, происходит снижение устойчивости к инфекционным заболеваниям, обусловленное нарушением синтеза метаболитов, ингибирующих воздействие фитопатогенных организмов (Terblanche et al., 2011; Zhao et al. 2017).

На данный момент времени для защиты культур от фитопатогенов сельскохозяйственных культур используют химические средства защиты — пестициды (Lengai et al., 2018). Данные препараты высокоэффективны и значительно снижают воздействие биотических стрессов на сельскохозяйственные культуры. Однако применение пестицидов характеризуется рядом экологических проблем. Исследования показывают, что целевых организмов достигает около 0,1 % пестицидов. Оставшаяся часть остаётся на поверхности почвы (Sun et al., 2018). Высокая стабильность таких препаратов обуславливает их длительное сохранение в окружающей среде, вызывая загрязнение почв, водоемов, а также атмосферы (Syed Ab Rahman et al., 2009). Пестициды обладают высокой способностью к биоаккумуляции, за счет чего

Рисунок 1

Валовой сбор зерна (в весе после доработки) в хозяйствах всех категорий

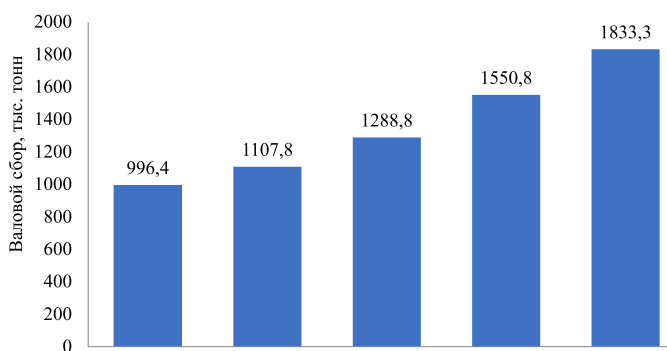
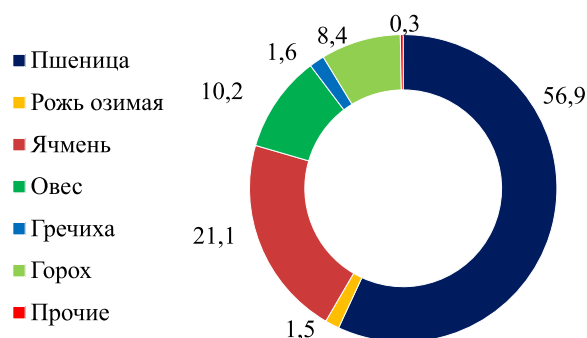


Рисунок 2

Структура производства зерна за 2022 год в процентах от общего объема



¹ Food Systems Dashboard. <https://www.foodsystemsdashboard.org/countries/rus#adult-obesity>.

² Сельское хозяйство, охота и лесное хозяйство. Инфографические материалы <https://42.rosstat.gov.ru/folder/95558>

³ Сельское хозяйство, охота и лесное хозяйство. <https://42.rosstat.gov.ru/folder/95558>

А. Ю. Просеков

проникают в пищевые цепочки и создают угрозу для здоровья животных и человека (Tao et al., 2021). Чрезмерное применение химических средств защиты растений обуславливает появление более агрессивных и вирулентных форм патогенов (Sang, et al. 2020).

Накопленная научная база, а также поощрение разработок на государственном уровне, привели к открытию биопестицидов — природных соединений или агентов, получаемых из растений и микроорганизмов для целенаправленной борьбы с сельскохозяйственными вредителями и патогенами (Kumar et al., 2021). Несмотря на многочисленные преимущества, связанные с применением биопестицидов, их доля составляет менее 1 % от общего объема мирового рынка средств защиты растений. В связи с этим, актуальным является расширение ассортимента и разработка новых биологических средств защиты растений.

Перспективным агентом для разработки микробных препаратов нового поколения являются эндофитные микроорганизмы или эндофиты. Такие микроорганизмы колонизируют ткани растений, не вызывая заболеваний и негативных эффектов (Morales-Cedeño et al., 2021). Обитая в тканях растений, эндофиты ускоряют рост и развитие растений за счет синтеза фитогормонов. Известно, также, что эндофиты способны защищать растение-хозяина путем индуцирования иммунной системы (Latz et al., 2018). В тоже время, эндофитные микроорганизмы остаются мало изученными. Пролить свет на их роль и функции могут omics-ные технологии.

Целью настоящего обзора предметного поля является обобщение и систематизация знаний об эндофитных микроорганизмах, полученных с применением omics-ных технологий.

Таблица 1

Критерии отбора источников

Критерий	Включено	Исключено	Причины
Популяция	Эндофитные микроорганизмы	Почвенные и ризосферные микроорганизмы	Целью настоящего обзора является обобщение и систематизация знаний об эндофитных микроорганизмах. Это связано с тем, что эндофитные микроорганизмы обладают рядом преимуществ за счет колонизации ткани растений.
Концепция	Исследования направленные на оценку ростостимулирующих свойств и вирулентности эндофитных микроорганизмов.	Исследования, направленные на оценку свойств эндофитных микроорганизмов, не оказывающих влияние на растения.	Настоящее исследование направлено на освещение свойств эндофитных микроорганизмов, которые применимы в сельском хозяйстве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Заявление о прозрачности и беспристрастности обзора

В данном обзоре проанализирована научная литература, соответствующая тематике исследования, оценено количество доступных исследований, выделены главные характеристики этих работ и неоткрытые аспекты, связанные с данной областью знаний согласно протоколу PRISMA-ScR.

Стратегия поиска

Поиск осуществляли в таких базах данных, как: Scopus, ScienceDirect, Scholar.google. Для поиска данных использовались поисковые запросы по ключевым словам и словосочетаниям: endophytes, endosphere, RNA, transcriptome, genes, wheat, barley, oats.

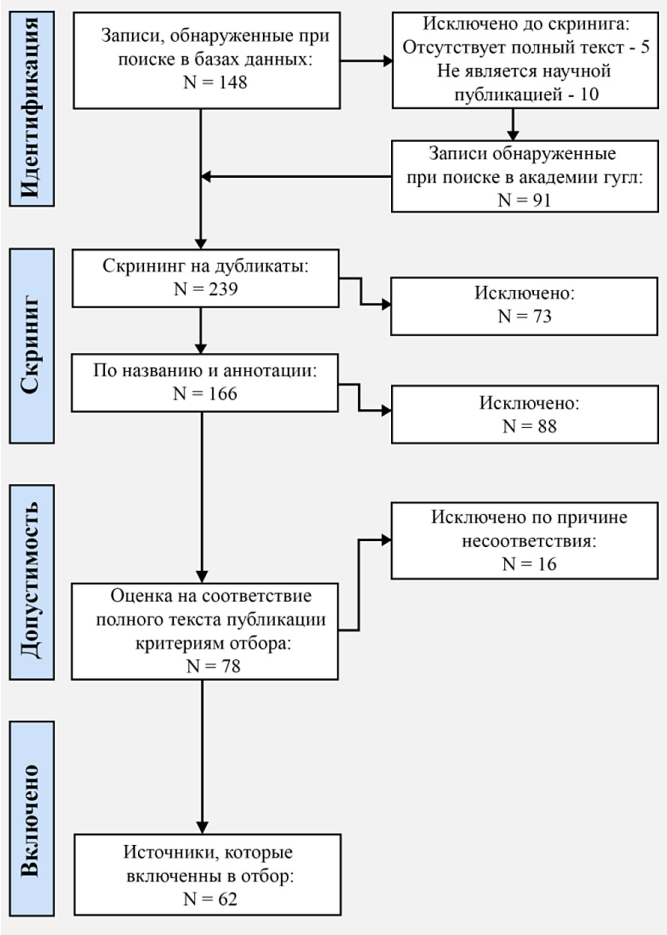
Критерии включения и исключения источников

В обзор предметной области включались только публикации, текст которых находится в открытом доступе. Если полный текст публикаций не удалось обнаружить, то статью исключали из исследования. В работе также не учитывались дубликаты и статьи, не соответствовавшие критериям отбора (по названию, аннотации или полному тексту). Критерии отбора представлены в Таблице 1.

Критерий	Включено	Исключено	Причины
Контекст	Исследования эндофитных микроорганизмов с использованием <i>omics</i> -ных технологий.	Исследования эндофитных микроорганизмов с использованием культурально-зависимых и других менее современных методов.	Настоящее исследование сконцентрировано на применении <i>omics</i> -ных технологий. Эта группа методов является наиболее современной и точной, а также позволяет оценить механизмы воздействия эндофитов на растения с новой точки зрения.
Язык	Любой	Ограничения отсутствуют	География распространения эндофитных микроорганизмов является обширной, в связи с этим оценивались работы на всех языках.
Временной период	По январь 2024 года	После января 2024 года	Статьи не ограничивали по временному периоду, так как <i>omics</i> -ные технологии являются сравнительно молодым методом исследования.
География	Любые страны	Ограничения отсутствуют	Исследуемая тематика актуальна для всех стран мира

Рисунок 3

Диаграмма процесса отбора статей для обзора предметного поля по PRISMA-ScR



При поиске в научных базах данных обнаружено 239 источников (Рисунок 3), из них: Scopus — 94, ScienceDirect — 13, Google Scholar — 132.

В процессе скрининга на присутствие дубликатов удалено 73 источника. После первичного скрининга названий и аннотаций из обзора предметной области исключено 88 исследований. В связи с этим к полнотекстовому скринингу на соответствие критериям отбора допущено 78 источников. В процессе анализа полного текста исключено 16 источников, из них 4 не соответствовали концепции; 12 контексту обзора научного поля работ. Всего в обзор предметного поля было включено 62 исследования.

Извлечение и визуализация данных

Из отобранных работ извлекали библиографические данные: имена и фамилии авторов, наименование публикации и журнала, год публикации, сведения о томе, выпуске, номере и страницах, на которых расположена публикация, а также doi. Также из исследования извлекались следующие сведения: имена авторов и информация о странах происхождения, цель и дизайн исследования, результаты и выводы, год публикации. Все включенные в обзор источники обрабатывали в программном обеспечении «VOSViewer» для наглядного представления частотности встречаемости ключевых слов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Описание отобранных публикаций

Информация о выбранных источниках была экспортирована из программного обеспечения «Zotero» в формате файла .ris. Обработку файла для предоставления ключевых слов в графическом формате осуществляли

с помощью программы «VOSviewer». В процессе обработки из 62 работ удалось извлечь 832 ключевых слова. Из них отобрано 44 ключевых слова, которые встречались более 2 раз. На рисунке 4 представлена карта визуализации взаимосвязи ключевых слов. Также составлена карта визуализации частоты встречаемости ключевых слов (Рисунок 5).

Рисунок 4

Карта взаимосвязи ключевых слов

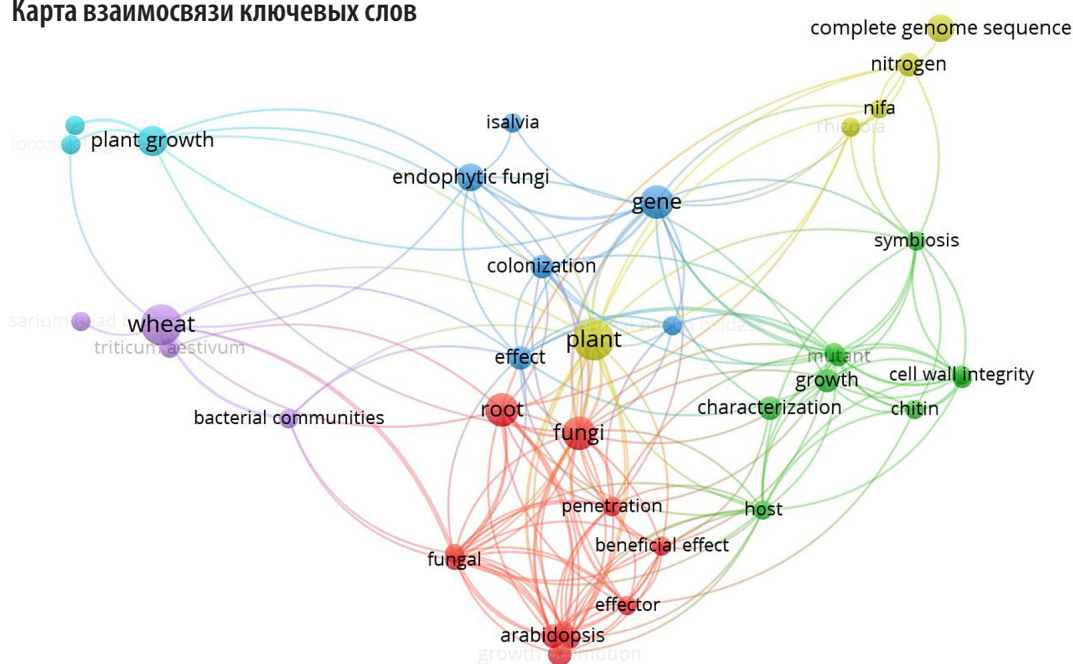
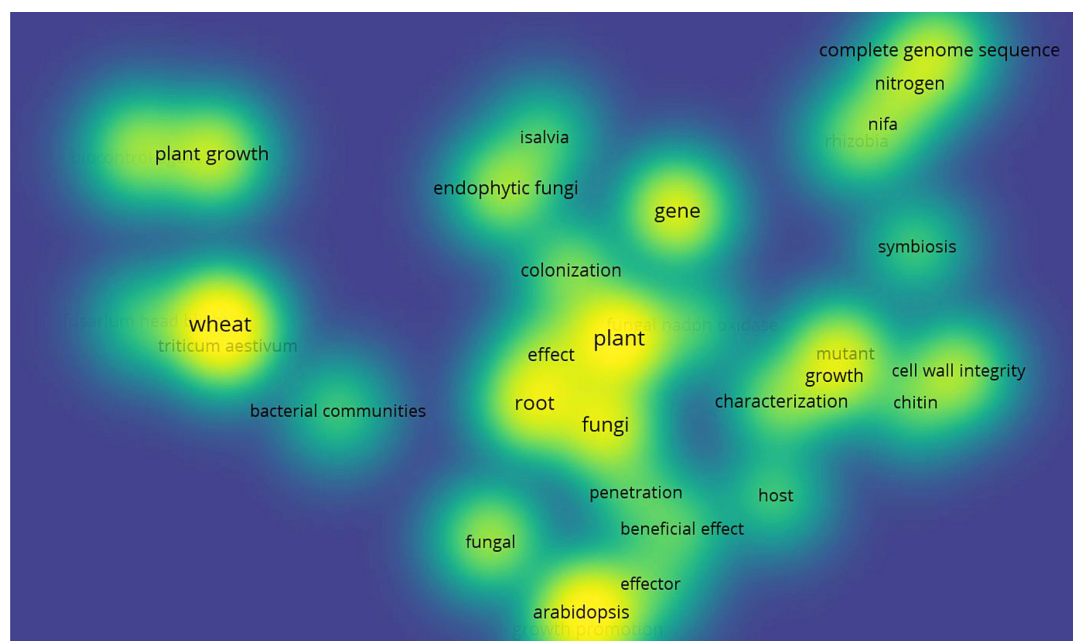


Рисунок 5

Частота встречаемости ключевых слов



А. Ю. Просеков

Чем чаще упоминается слово, тем больше размер точки его обозначающей. Связь между ключевыми словами в исследованиях обозначаются цветом и линиями. VOSviewer позволил установить, что в отобранных работах наиболее часто встречаются следующие ключевые слова (за исключением основных понятий): plant, colonization, fungi, root, symbiosis.

Также проанализировали частоту встречаемости ключевых слов по году выпуска статьи. Результаты отражены на Рисунке 6.

Частота встречаемости ключевых слов по годам

Период публикаций, выбранных для анализа ключевых терминов, охватывает интервал с 2012 по 2018 год. Максимальная интенсивность публикационной активности по анализируемой тематике была зафиксирована начиная с 2014 года. Авторы исследований представляют широкий географический спектр, включающий 30 стран, среди которых Испания, Сингапур, Соединенные Штаты Америки, Польша, Мексика, Китай, Турция, Оман, Дания, Пакистан, Саудовская Аравия, Германия, Италия, Нидерланды, Россия, Индия, Франция, Швеция, Канада, Египет, Республика Корея, Новая Зеландия, Бразилия, Аргентина, Иран, Япония, Швейцария, Австрия, Великобритания и Бельгия.

Детальный анализ источников выявил преимущественное использование методик omics-ных технологий для исследования эндофитных микроорганизмов, включая геномику, метагеномику и транскриптомику. Синтезированные данные, полученные с использованием этих методологий, представлены в последующем обзоре.

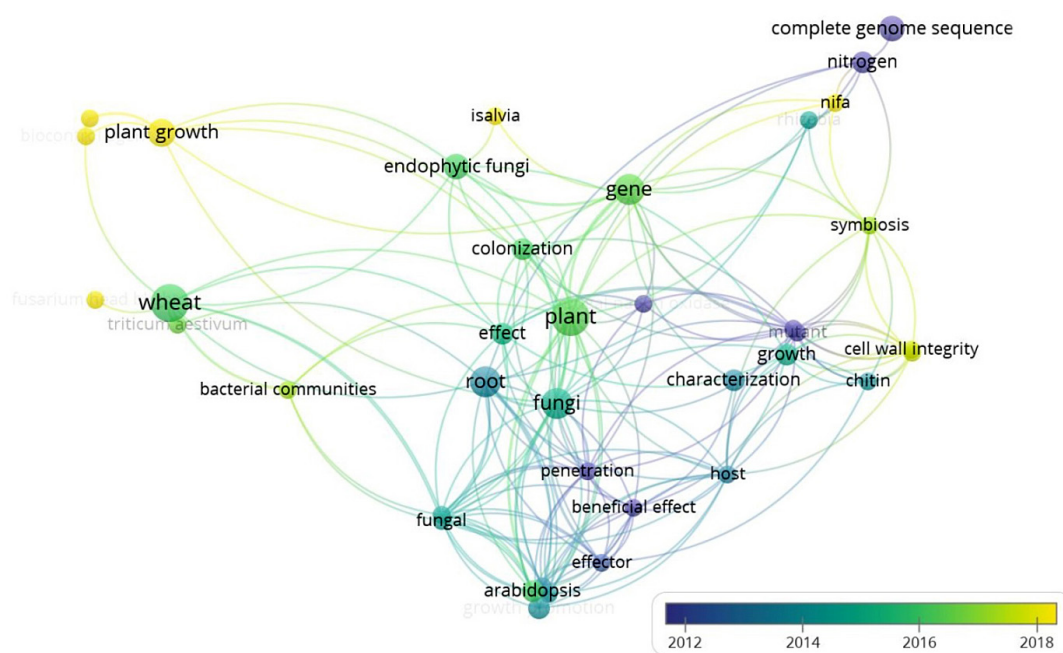
Геномика и метагеномика эндофитных микроорганизмов

Молекулярную основу эндофитного разнообразия бактерий и грибов и их взаимодействия с растениями-хозяевами можно охарактеризовать с помощью методов omics-ных технологий, в частности метагеномики, которая является одним из основных аспектов геномных исследований.

Несмотря на то, что в настоящий момент изучено большое количество бактериальных геномов, количество полных геномов бактериальных эндофитов, способствующих росту растений, до сих пор не велико. На сегодняшний день секвенировали геномы следующих бактериальных эндофитов: *Azoarcus* sp. BH72, *Azospirillum* *Lipoferum* 4B, *B. phytofirmans* PsJN, *Burkholderia* spp. KJ006, *Enterobacter* sp. 638, *G. diazotrophicus* Pal5, *Klebsiella pneumoniae* 342, *Pseudomonas putida* W619,

Рисунок 6

Частота встречаемости ключевых слов по годам



А. Ю. Просеков

Pseudomonas stutzeri A1501, *Serratia proteamaculans* 568, *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3 и др. (Fouts et al., 2008; Yan et al., 2008; Bertalan et al., 2009; Taghavi et al., 2009; Weilharter et al., 2011; Kwak et al., 2012).

В вышеупомянутых геномах обнаружены многочисленные признаки, связанные со стимулированием роста растений (фиксация азота, синтез фитогормонов, синтез АСС дезаминазы, противогрибкового действия, и др.) за исключением эндофита *E. cloacae* ENHKU01, выделенного из больного растения перца (*Capsicum annuum* L.). Данный вид часто встречается как условно-патогенный микроорганизм человека, при этом функциональная роль штамма при взаимодействии с растением-хозяином не установлена.

Основываясь на том, что геном *Azoarcus* не содержит гены, ответственные за многие факторы вирулентности (например, систему секреции III и IV типов (T3SS, T4SS)), ученые выдвинули гипотезу о том, что эндофиты могут рассматриваться как «обезоруженные патогены» (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011). Секреция белка и, в частности, доставка эффекторных белков хозяину, которая опосредуется у граммотрицательных патогенов или ризобийных симбионтов главным образом через T3SSs, являются важными стратегиями подавления защитного ответа хозяина (Gil-Gil et al., 2023). Мутанты T3SS обладают повышенной эндофитной колонизацией. В связи с этим можно предположить, что колонизация корней микроорганизмами протекает лучше при неспособности продуцировать элиситоры.

Изучение других секвенированных геномов эндофитов подтвердило эти наблюдения. В то время как общие системы (T1SSs и T2SSs) достаточно распространены, T3SSs или T4SSs чрезвычайно редки или отсутствуют среди изученных эндофитов. Это позволяет предположить, что механизмы модуляции реакции растений, используемые симбионтами или патогенами (Downie, 2010), не являются общими во взаимодействиях растений и эндофитов. При этом гены автотранспортеров (T5SS) были обнаружены у большинства эндофитов (Таблица 2).

Также по меньшей мере два кластера генов для недавно распознанной системы секреции VI типа (T6SS) присутствовали в геноме эндофитов, у которых в основном отсутствовал T4SS. T6SS распространены у протеобактерий, а различные патогенные бактерии (*Burkholderia*, *Yersinia*, *Pseudomonas*) обладали большим количеством кластеров генов T6SS (Boyer et al., 2009). Последующие

исследования в данной сфере могут объяснить, играют ли эти системы секреции белка определенную роль в эндофитном образе жизни и какие белки при этом секретируются.

Геномы других эндофитных микроорганизмов содержали гены, кодирующие различные признаки, в том числе способствующие росту растений. К ним относятся гены, кодирующие азотфиксацию, дезаминазную активность АСС, биосинтез сидерофоров., производство фитогормонов (индолил-3-уксусная кислота, ацетоин, 2,3-бутандиол) и синтез антимикробных соединений (Santoyo et al., 2016).

Некоторые исследователи попытались отследить гены, ответственные за эндофитный образ жизни микроорганизмов (Fadiji et al., 2021; Li et al., 2023). В настоящее время механизмы до конца не изучены, поскольку способность проникать и выживать внутри тканей растений многофакторна.

Биоинформатический подход позволяет прогнозировать некоторые ключевые особенности, которые отличают эндофитные ростостимулирующие штаммы от ризосферных. Так, в исследовании Ali et al. (2014) сравнивали последовательности геномной ДНК ризосферного и эндофитного вида, принадлежащих к роду *Burkholderia*, при этом гены, кодируемые ризосфер-

Таблица 2

Особенности генома эндофитных микроорганизмов

Штамм	Type III SS	Type IV SS	Type V SS	Type VI SS	TonB DR
<i>P. putida</i> W619	–	–	5	2	22
<i>P. stutzeri</i> A150	–	–	1	–	12
<i>Azoarcus</i> sp. BH72	–	–	1	2	22
<i>H. seropedica</i> SmR1	1	–	–	2	23
<i>G. diazotro</i> . Pal5	–	4	5	–	6
<i>Azospirillum</i> sp. B510	–	–	4	2	9
<i>K. pneumoniae</i> 342	–	1	3	3	13
<i>Enterobacter</i> sp. 638	–	–	8	–	12
<i>M. populi</i> BJ001	–	1	–	–	23
<i>Serratia proteamaculans</i> 568	–	–	10	2	12
<i>S. maltoph.</i> R551-3	–	1	9	–	66

Примечание. Adapted from «Living inside plants: Bacterial endophytes» by B. Reinhold-Hurek, and T. Hurek, 2011, .Current Opinion in Plant Biology, 14(4), P. 435–443 (<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.004>). Copyright 2011 by the Elsevier Ltd.

ным штаммом, были вычтены из эндофитного штамма. Затем оставшиеся предполагаемые эндофитные гены сравнивали с полными геномами восьми различных эндофитных ростостимулирующих микроорганизмов. Предполагается, что гены, общие для данных штаммов, потенциально участвуют в эндофитном поведении. К ним относились гены, кодирующие белки-транспортеры, системы секреции и доставки, деградацию или модификацию растительных полимеров, регуляцию транскрипции, детоксикацию, поддержание окислительно-восстановительного потенциала, и др. с неустановленными функциями (Santoyo et al., 2016).

Учеными обнаружено 36 генов, ответственных за эндофитный образ жизни микроорганизмов (Fadiji et al., 2021; Li et al., 2023). Среди этих генов следует отметить те, которые участвуют в хемотаксисе и подвижности, такие как аэротаксис (*aer*), регулятор белков (*cheC*, *cheD*, *cheV* и *cheZ*) и подвижность (*fliA*, *flhB*, *flhF* и *fliL*). Другие включают регуляторы транскрипции: регуляция хранения углерода (*Csr*), образование биопленки (*sdiA*), восстановление оксида азота (*norR*), регуляция резистентности к бета-лактамазам (*ampR*) и регуляция азота (*nifA*).

Регуляторный ген *nifA* кодирует белок NifA — активатор транскрипции, и известен как главный регулятор нитрогеназы у протеобактериальных diaзотрофов (Demtröder et al., 2019). NifA является энхансерным элементом и запускает экспрессию всех генов, ответственных за фиксацию азота, а также является конечным звеном в сигнальном каскаде активации генов нитрогеназного комплекса (Baumiev et al., 2019).

Система *Csr* является одним из немногих известных бактериальных мРНК-белковых регуляторов. Она влияет на широкий спектр генов, которые отвечают за вирулентность и метаболизм бактерий (Sowa, et al. 2017). Кроме того, идентифицированы гены, участвующие в системах секреции, таких как секреция типа III (*ycsJ*), конъюгальная ДНК типа IV (*virB2*) и сборка пилуса типа I (*fimA*). Обнаружена группа генов, участвующих в транспортной системе, включая систему фосфотрансферазы, транспортер трикарбоксилатов (*tctA*) и метилдикарбоксилат (*dctA*). Гены *ipdC* и *iaaM*, кодирующие индол-3-пируватдекарбоксилазу и триптофан-2-монооксигеназу соответственно, которые участвуют в биосинтезе важного фитогормона, называемого индолил-3-уксусная кислота, из триптофана (Sugawara et al., 2015).

Транскриптомика

Генетические аспекты колонизации растений эндофитами

Многочисленные научные исследования подтверждают, что эндофиты способствуют росту растений, ускоряют обмен веществ и увеличивают устойчивость растений к стрессу. В то же время взаимодействие между эндофитом и растением-хозяином представляет сложный процесс, включающий различные механизмы реагирования. В связи с этим изучить его не так просто. Однако методы транскриптомики позволяют получить глубокие знания об этих механизмах (Sánchez-Vallet et al., 2013; Straub et al., 2013; Sánchez-Vallet et al., 2015).

Транскриптомные исследования касаются различных аспектов взаимодействия растений и эндофитов, начиная с распознавания и колонизации эндофитов до устойчивости к стрессу. На этапе распознавания эндофитные микроорганизмы демонстрируют различные механизмы взаимодействия с растениями-хозяевами, позволяющие уклоняться от его защитных механизмов. Например, ряд грибных эндофитов маскируют хитин, чтобы предотвратить дальнейшие защитные реакции (Sánchez-Vallet et al., 2015), подавлять выработку салициловой кислоты растениями и стимулировать биосинтез жасминовой кислоты (Straub et al., 2013). Так, структурный анализ эффектора LysM Eср6 грибкового патогена томата *Cladosporium fulvum* выявил новый механизм связывания хитина, опосредованный внутрицепочечной димеризацией LysM. Этот процесс приводит к образованию бороздки, способной связываться с хитином. Хотя единичный домен LysM Eср6 обладает низким микромолярным сродством к хитину, он нарушает иммунитет, который обычно запускается при контакте с данным веществом (Sánchez-Vallet et al., 2013).

Некоторые эндофиты используют регулирующие пути, нацеленные на микроРНК для того, чтобы избежать действия защитной системы растения-хозяина (Plett et al., 2018). На этапе распознавания соединения, секретируемые эндофитами, поступают в организм растения-хозяина и способствуют его росту (Jiang et al. 2019; Lu et al. 2019). Они активируют как стрессовые, так и защитные реакции против патогенов. Vahabi et al. (2015) доказали, что содержание жасминовой кислоты в *Arabidopsis*, инокулированном *S. indica*, значительно снижалось по сравнению с содержанием салициловой кислоты. Такое явление не наблюдалось у растений,

не контактирующих с эндофитом. Ученые также обнаружили, что метаболиты гриба вызывают закрытие устьиц, стимулируют выработку активных форм кислорода, накопление фитогормонов, связанных со стрессом, и активацию генов, ответственных за защиту и стресс в корнях и/или побегах. Интересно отметить, что после колонизации все эти показатели возвращаются к нормальным значениям.

Malinich et al. (2019) продемонстрировали, что взаимодействие между *Trichoderma virens* и кукурузой приводит к снижению образования салициловой кислоты в растении. Вследствие этого прекращается выработка катехола, что делает растения более восприимчивыми к воздействию патогенов. При этом гены, отвечающие за синтез жасминовой кислоты, активируются, чтобы сформировать индуцированную системную резистентности к некротрофам. Интересно, что уровни салициловой кислоты в растениях, колонизированных *Trichoderma virens*, практически ничем не отличаются от уровней в неколонизированных растениях (Ambrose et al., 2015). То есть, физический контакт между этими двумя симбионтами может не привести к повышению уровня салициловой кислоты, но всё же считается достаточным для установления системной защиты (Constantin et al., 2019).

После преодоления конкурирующей микробиоты растения и физических барьеров эндофиты могут применять различные стратегии, чтобы не стать целью защитных реакций хозяина. Эндофитные бактерии формируют собственные митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK) (Vandenkoornhuysen et al., 2015) или производят ферменты в ответ на иммунную систему хозяина, тогда как грибковые эндофиты полагаются на секрецию хитиндиацетилазы или грибковых лектинов (Lahrmann & Zuccaro et al., 2012). Это не единственное отличие эндофитных микроорганизмов от фитопатогенов. Эндофиты ограничивают свое собственное пространство колонизации, не «переступая порог» и не «подавляя» растение на критической фазе колонизации (Constantin et al., 2019; De Palma et al., 2019). В отличие от патогенных микробов, которые вызывают системную приобретенную устойчивость посредством передачи сигнальной молекулы салициловой кислоты, эндофиты регулируют передачу сигналов за счет жасминовой кислоты и этилена, индуцируя системную резистентность, что повышает устойчивость надземных частей растений к биотическому стрессу.

Аспекты положительного влияния эндофитов на растения

По мере продолжения фазы колонизации развиваются эндосимбиотические отношения, которые приносят пользу обоим организмам. Растения-хозяева поддерживают эндофитные сообщества в специфических тканях, снабжая их питательными веществами (Hao et al., 2017). На первых этапах колонизации растения-хозяева способствуют установлению симбиотической связи, активируя гены эндофитов, которые отвечают за перемещение, хемотаксис и адгезию. Это достигается путем увеличения выделения белков, ассоциированных с прикреплением, ремоделированием клеточной стенки и абсорбцией с помощью транспортеров ABC (Pankiewicz et al., 2016). Например, *Azoarcus* sp. BH72 секретирует транспортеры типа V, такие как Azo1684 и Azo1653, чтобы проникнуть в ткань риса (Utturkar et al., 2016).

Благодаря сложному взаимодействию с растениями многочисленные эндофиты способствуют росту растений даже в условиях стрессовых факторов. Так, например, инокуляция *S. indica* способствовала лучшему развитию корней за счет увеличения экспрессии генов биосинтеза индол-3-уксусной кислоты AXR1 и AUX1 в ячмене (Ghaffari et al., 2016), а также усиления регуляции генов, кодирующих ферменты, связанные с биосинтезом жирных кислот. Это привело к улучшению репродуктивного роста и улучшению качества масла *Brassica napus* (Hashem et al., 2017). Сообщается также, что эндофитные грибы, выделенные из видов рода *Noccea*, усиливают экспрессию переносчиков ионов и генов, связанных с биосинтезом жирных кислот, что способствует росту растений (Ważny et al., 2021).

Помимо активированных генов, связанных с ростом растений, эндофит может также влиять на накопление первичных и вторичных метаболитов растений, усиливая их рост. Jiang et al. (2019) отметили, что эндофитные грибы смогли индуцировать накопление таншинона в организме *S. miltiorrhiza* Bunge после заражения. Это происходило за счет активации 14 ключевых генов ферментов: DXS, DXS2, DXR, HMGR3, AACT, MK, PMK, GGPPS2, GGPPS, KSL, IDI, IPH, FDPS и CPS.

Основными эндогенными факторами, отвечающими за адаптацию растения к окружающей среде, являются не только антиоксидантные метаболиты, но и фитогормоны. Например, в условиях солевого стресса эндофитные микроорганизмы в основном индуцировали

гены, участвующие в биосинтезе и передаче сигналов фитогормонов (ауксина, жасминовой кислоты и этилена), транспорте железа и улавливании активных форм кислорода (Qin et al., 2018; Eida et al., 2019)

В условиях засухи эндофитные грибы функционируют иначе, чем эндофитные бактерии. Например, *S. indica* повышал уровни ауксина, АБК, СК и цитокинина, что усиливало экспрессию генов, участвующих в реакции растений-хозяев кукурузы на стресс засухи (Zhang et al., 2018), в то время как *T. harzianum* улучшал устойчивость риса к засухе за счет модулирования активности генов аквапорина и дегидрина, белка, связывающего элементы, чувствительные к дегидратации, и супероксиддисмутазы (Pandey et al., 2016).

Транскриптомика также может обеспечить глубокое понимание молекулярных особенностей, которые лежат в основе переключения образа жизни грибов с эндофитного на патогенное состояние (Kage et al., 2017). Zhou и соавт. (2018) показали, что экспрессия генов как при эндофитном, так и при сапрофитном образе жизни *D. liquidambaris* находится под сильным влиянием окружающей среды хозяина. Было высказано предположение о том, что сигнальный путь MAPK может быть вовлечен в изменение образа жизни грибов. Becker и соавт. (2015) обнаружили, что целостность клеточной стенки MAPK является важнейшим сигнальным путем для поддержания мутуалистического симбиотического взаимодействия.

Epichloë festucae с райграсом многолетним. С другой стороны, активируемая стрессом передача сигналов пути MAPK и продукция активных форм кислорода грибковым комплексом НАДФН-оксидазы (Nox) являются ключевыми механизмами, которые поддерживают стабильную мутуалистическую ассоциацию между *E. festucae* и райграсом (Segmüller et al., 2008). В связи с этим, когда растения заражаются эндофитными грибами, лишенными функциональных комплексов Nox или активируемой стрессом передачи сигналов MAPK, хозяин может демонстрировать более медленный рост, в то время как гриб имеет пролиферативный рост, приводящий к переключению образа жизни с эндофитного на патогенный (Lu et al., 2021). Такой результат наблюдался у *C. minitans* (Wei et al., 2016), *B. cinerea* (Segmüller et al., 2008) и *D. Liquidambaris* (Zhou et al., 2018).

В тоже время эндофиты также оказывают существенное влияние за защиту растений от биотических

стрессов. Так, однократная инокуляция эндофитной *Bacillus megaterium*, выделенной из корня черного перца, способствует повышению роста семян *A. thaliana* Col O за счет активации генов, связанных с биотическим стрессом, таких как MYB4, MYB7, WRR4, ATOSM34 и ATHCHIB (Vibhuti et al., 2017).

Эндофитные микроорганизмы зерновых культур

На данный момент данных о механизмах взаимодействия эндофитных микроорганизмов и злаковых культур не достаточно в научной литературе. Наиболее изученными являются эндофиты пшеницы. Экологическая роль и частота встречаемости эндофитов пшеницы грибковой природы особенно изучена в отношении семейства *Clavicipitaceae*, где род *Neotyphodium* и *Epichloë* являлись модельной системой. Также хорошо изучены и известны своей ассоциацией с пшеницей *Epichloë* и *Neotyphodium* (Card et al., 2014).

В тоже время существует пробел в знаниях о жизненных циклах и экологической роли большинства других эндофитов. Это связано с тем, что современное понимание грибковых эндофитов пшеницы построено на довольно небольшом наборе экспериментальных условий, включая генотипы пшеницы, органы растений, ткани растений, стадии развития растений или условия окружающей среды (Granzow, et al., 2017; Karlsson et al. 2017; Mahoney et al., 2017; Yin et al. 2017; Kothe et al. 2018; Al-Sadi, 2021). Более того, большая часть исследований основана на культурально-зависимых методах, которые исключают биотрофные и медленнорастущие виды, и способствуют обнаружению быстрорастущих грибов (Mahoney et al., 2017; Alkan et al., 2021).

В научной литературе показано, что среди эндофитов, выявленных у пшеницы, некоторые проявляют симбиотическую кооперацию с этим растением. Предыдущие исследования (Ikram et al., 2020) эндофитных грибов показали, что эндофитный штамм *Chaetomium* sp. снижал негативное воздействие на растение *P. recondite* f. В свою очередь эндофитный штамм *T. hamatum* отмечен как потенциальный агент биоконтроля в отношении возбудителя коричневых пятен пшеницы — *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler (Larran et al., 2016). Comby и др. (Comby et al., 2017) обнаружили в пшенице эндофитные грибы, которые можно использовать для защиты растений от *F. graminearum*, который является причи-

ной развития фузариоза колоса. Эти грибы относились к следующим видам: *S. kiliense*, *A. proteae*, *C. rosea* и *M. bolleyi*. Схожий эффект отмечен у: *S. strictum*, *A. flocculosa* и *P. Olsonii* (Rojas et al., 2020).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассмотренные научные публикации открывают широкое поле для дальнейшего изучения эндофитных микроорганизмов с использованием современных молекулярно-генетических методов. На данный момент сделан значительный шаг в понимании механизмов эндофитного поведения в сравнении с ризосферными микроорганизмами, а также фитопатогенами.

К выявленным трендам применения эндофитных микроорганизмов относится биостимуляция сельскохозяйственных культур. Это связано с тем, что некоторые эндофиты способны продуцировать ростостимулирующие вещества, а также улучшать питание растений, например, путем фиксации азота из атмосферы. Улучшение питания растений биологическими методами позволяет сократить использование химических удобрений, что соответствует современной тенденции к переходу на систему органического земледелия. Использование эндофитных микроорганизмов также способствует повышению устойчивости растений к стрессовым условиям.

Другой тренд — применение эндофитных микроорганизмов в биологическом контроле инфекционных заболеваний. Некоторые эндофиты обладают антагонистической активностью в отношении патогенных микроорганизмов, таким образом, они могут быть использованы в качестве аналогов химическим пестицидам для защиты растений от болезней.

Выявленные тренды согласуются с предыдущими обзорами в рамках данной тематики (Ahmed et al., 2023; Chetia et al., 2019; Saini et al., 2024). Однако ранние обзоры посвящались отдельному аспекту применения эндофитных микроорганизмов, что не позволяло оценить перспективы комплексно. Также, значительная часть обзоров основана на исследовательских работах, применяющих менее современные методы в сравнении с методами omics (Fadiji & Babalola, 2020; Khare et al., 2018), поэтому отсутствуют параллели между оценкой свойств эндофитов и их генетическим аппаратом.

Анализ отобранных для обзора публикаций также продемонстрировал возрастающий интерес к применению эндофитов для выращивания зерновых культур у иссле-

дователей по всему миру (Granzow et al., 2017; Karlsson et al., 2017; Mahoney et al., 2017; Yin et al. 2017; Kothe et al., 2018; Al-Sadi, 2021). Это может быть связано с тем, что растущее население планеты обуславливает необходимость в увеличении темпов производства сельскохозяйственной продукции, а значимую роль в обеспечении продовольственной безопасности большинства стран играют именно зерновые культуры.

Несмотря на возрастающую значимость молекулярно-генетических методов в научных исследованиях, на данный момент времени особенности геномов эндофитных микроорганизмов мало освещены. Это может быть связано со сложностями в использовании данных технологий. В некоторых случаях качество данных, полученных с помощью методов omics, может быть низким. Например, возникает проблема с низкой разрешающей способностью анализирующих приборов или недостаточным объемом образцов для анализа, что приводит к ограничению точности и достоверности результатов обзорного исследования. Кроме того, не все исследователи могут применять современные методы в связи с ограничениями во времени и ресурсах. Проведение полноценного исследования с использованием методов omics требует значительных временных и ресурсных затрат.

Настоящий обзор характеризуется следующими ограничениями: (1) анализировались публикации, полный текст которых доступен в открытом доступе, что может ограничить обзорный анализ достижений и тенденций в данной области; (2) включались только исследования, описывающие эндофитный образ жизни микроорганизмов с использованием omics-технологий, исключая данные, основанные на культурально-зависимых методах.

ВЫВОДЫ

Включение эндофитных микроорганизмов в состав биопестицидов является актуальным в связи с их высокой антагонистической активностью в отношении фитопатогенов. Эндофиты колонизируют непосредственно ткани растений, благодаря чему их действие является пролонгированным. Эндофиты также продуцируют различные ростостимулирующие вещества, что позволяет не только защитить сельскохозяйственные культуры от биотических стрессов, но также ускорить их рост и повысить продуктивность. Известны случаи выделения эндофитных микроорганизмов из зерновых куль-

тур. Тем не менее представители эндофитных микроорганизмов злаковых культур до сих пор мало изучены. В связи с этим необходимо проведение дополнительных исследований с применением omics-ных технологий, для понимания их экологических функций. Разви-

тие данной сферы исследований необходимо, так как применение эндофитных микроорганизмов в качестве биоконтроля распространения фитопатогенов может являться многообещающей стратегией устойчивого развития агропромышленного комплекса.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ahmed, A., He, P., He, Y., Singh, B. K., Wu, Y., Munir, S., & He, P. (2023). Biocontrol of plant pathogens in omics era — With special focus on endophytic bacilli. *Critical Reviews in Biotechnology*, 43, 1–19. <https://doi.org/10.1080/07388551.2023.2183379>
- Ali, S., Duan, J., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014). A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. *Journal of Theoretical Biology*, 343, 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.10.007>
- Alkan, M., Özer, G., İmren, M., Özdemir, F., Morgounov, A., & Dababat, A. A. (2021). First report of *Fusarium culmorum* and *Microdochium bolleyi* causing root rot on triticale in Kazakhstan. *Plant Disease*, 105(7). <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2659-PDN>
- Al-Sadi, A. M. (2021). Bipolaris sorokiniana-induced black point, common root rot, and spot blotch diseases of wheat: A review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 584899. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.584899>
- Ambrose, K. V., Tian, Z., Wang, Y., Smith, J., Zylstra, G., Huang, B., & Belanger, F. C. (2015). Functional characterization of salicylate hydroxylase from the fungal endophyte *Epichloë festucae*. *Scientific Reports*, 5(1), 10939. <https://doi.org/10.1038/srep10939>
- Baymiev, A. K., Gumenko, R. S., Vladimirova, A. A., Akimova, E. S., Vershinina, Z. R., & Baymiev, A. K. (2019). Artificial activation of NIF gene expression in nodule bacteria *Ex Planta*. *Ecological Genetics*, 17(2), 35–42. <https://doi.org/10.17816/ecogen17235-42>
- Becker, Y., Eaton, C. J., Brasell, E., May, K. J., Becker, M., Hassing, B., Cartwright, G. M., Reinhold, L., & Scott, B. (2015). The fungal cell-wall integrity MAPK cascade is crucial for pyphal network formation and maintenance of restrictive growth of *Epichloë festucae* in symbiosis with *Lolium perenne*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(1), 69–85. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-14-0183-R>
- Bertalan, M., Albano, R., De Pádua, V., Rouws, L., Rojas, C., Hemerly, A., Teixeira, K., Schwab, S., Araujo, J., Oliveira, A., França, L., Magalhães, V., Alquéres, S., Cardoso, A., Almeida, W., Loureiro, M. M., Nogueira, E., Cidade, D., Oliveira, D., Simão, T., Macedo, Jacyara, Valadão, A., Dreschsel, M., Freitas, F., Vidal, M., Guedes, H., Rodrigues, E., Meneses, C., Brioso, P., Pozzer, L., Figueiredo, D., Montano, H., Junior, J., De Souza Filho, G., Martin Quintana Flores, V., Ferreira, B., Branco, A., Gonzalez, P., Guillobel, H., Lemos, M., Seibel, L., Macedo, José, Alves-Ferreira, M., Sachetto-Martins, G., Coelho, A., Santos, E., Amaral, G., Neves, A., Pacheco, A. B., Carvalho, D., Lery, L., Bisch, P., Rössle, S. C., Ürményi, T., Rael Pereira, A., Silva, R., Rondinelli, E., Von Krüger, W., Martins, O., Baldani, J. I., & Ferreira, P. C. (2009). Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pa15. *BMC Genomics*, 10(1), 450. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-450>
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., & Attree, I. (2009). Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: What can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, 10(1), 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-104>
- Card, S. D., Faville, M. J., Simpson, W. R., Johnson, R. D., Voisey, C. R., De Bonth, A. C. M., & Hume, D. E. (2014). Mutualistic fungal endophytes in the *Triticeae* — Survey and description. *FEMS Microbiology Ecology*, 88(1), 94–106. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12273>
- Chetia, H., Kabiraj, D., Bharali, B., Ojha, S., Barkataki, M. P., Saikia, D., Singh, T., Mosahari, P. V., Sharma, P., & Bora, U. (2019). Exploring the benefits of endophytic fungi via omics. In B. P. Singh (Ed.), *Advances in Endophytic Fungal Research* (pp. 51–81). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-03589-1_4
- Comby, M., Gacoin, M., Robineau, M., Rabenoelina, F., Ptas, S., Dupont, J., Profizi, C., & Baillieul, F. (2017). Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head blight using two different in vitro tests. *Microbiological Research*, 202, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.014>
- Constantin, M. E., De Lamo, F. J., Vlieger, B. V., Rep, M., & Takken, F. L. W. (2019). Endophyte-mediated resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* is independent of ET, JA, and SA. *Frontiers in Plant Science*, 10, 979. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00979>
- De Palma, M., Salzano, M., Villano, C., Aversano, R., Lorito, M., Ruocco, M., Docimo, T., Piccinelli, A. L., D'Agostino, N., & Tucci, M. (2019).

- Transcriptome reprogramming, epigenetic modifications and alternative splicing orchestrate the tomato root response to the beneficial fungus *Trichoderma harzianum*. *Horticulture Research*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0079-1>
- Demtröder, L., Pfänder, Y., Schäfermann, S., Bandow, J. E., & Masepohl, B. (2019). NifA is the master regulator of both nitrogenase systems in *Rhodobacter capsulatus*. *MicrobiologyOpen*, 8(12), e921. <https://doi.org/10.1002/mbo3.921>
- Downie, J. A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 150–170. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x>
- Eida, A. A., Alzubaidy, H. S., De Zélicourt, A., Synek, L., Alsharif, W., Lafi, F. F., Hirt, H., & Saad, M. M. (2019). Phylogenetically diverse endophytic bacteria from desert plants induce transcriptional changes of tissue-specific ion transporters and salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 280, 228–240. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.12.002>
- Fadji, A. E., Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2021). Unveiling the putative functional genes present in root-associated endophytic microbiome from maize plant using the shotgun approach. *Journal of Applied Genetics*, 62(2), 339–351. <https://doi.org/10.1007/s13353-021-00611-w>
- Fadji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Exploring the potentialities of beneficial endophytes for improved plant growth. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3622–3633. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.002>
- Figueroa, M., Hammond-Kosack, K. E., & Solomon, P. S. (2018). A review of wheat diseases — a field perspective. *Molecular Plant Pathology*, 19(6), 1523–1536. <https://doi.org/10.1111/mpp.12618>
- Fouts, D. E., Tyler, H. L., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Ren, Q., Badger, J. H., Durkin, A. S., Huot, H., Shrivastava, S., Kothari, S., Dodson, R. J., Mohamoud, Y., Khouri, H., Roesch, L. F. W., Krogfelt, K. A., Struve, C., Triplett, E. W., & Methé, B. A. (2008). Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genetics*, 4(7), e1000141. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000141>
- Ghaffari, M. R., Ghabooli, M., Khatabi, B., Hajirezaei, M. R., Schweizer, P., & Salekdeh, G. H. (2016). Metabolic and transcriptional response of central metabolism affected by root endophytic fungus *Piriformospora indica* under salinity in barley. *Plant Molecular Biology*, 90(6), 699–717. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0461-z>
- Gil-Gil, T., Cuesta, T., Hernando-Amado, S., Reales-Calderón, J. A., Corona, F., Linares, J. F., & Martínez, J. L. (2023). Virulence and metabolism crosstalk: Impaired activity of the Type three Secretion System (T3SS) in a *Pseudomonas aeruginosa* crc-defective mutant. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12304. <https://doi.org/10.3390/ijms241512304>
- Granzow, S., Kaiser, K., Wemheuer, B., Pfeiffer, B., Daniel, R., Vidal, S., & Wemheuer, F. (2017). The effects of cropping regimes on fungal and bacterial communities of wheat and faba bean in a greenhouse pot experiment differ between plant species and compartment. *Frontiers in Microbiology*, 8, 902. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00902>
- Hao, K., Wang, F., Nong, X., McNeill, M. R., Liu, S., Wang, G., Cao, G., & Zhang, Z. (2017). Response of peanut *Arachis hypogaea* roots to the presence of beneficial and pathogenic fungi by transcriptome analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 964. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01029-3>
- Hashem, A., Abd_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Radhakrishnan, R., & Kumar, A. (2017). Plant defense approach of *Bacillus subtilis* (BERA 71) against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in mung bean. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 390–401. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1373871>
- Sang, H., Lee, H. B., Molecular Mechanisms of Succinate Dehydrogenase Inhibitor Resistance in Phytopathogenic Fungi. (2020). *Research of Plant Diseases*, 26(1), 1–7. <https://doi.org/10.5423/RPD.2020.26.1.1>
- Ikram, M., Ali, N., Jan, G., Jan, F. G., & Khan, N. (2020). Endophytic fungal diversity and their interaction with plants for agriculture sustainability under stressful condition. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 11(2), 115–123. <https://doi.org/10.2174/2212798410666190612130139>
- Jiang, C.-H., Xie, Y.-S., Zhu, K., Wang, N., Li, Z.-J., Yu, G.-J., & Guo, J.-H. (2019). Volatile organic compounds emitted by *Bacillus* sp. JC03 promote plant growth through the action of auxin and strigolactone. *Plant Growth Regulation*, 87(2), 317–328. <https://doi.org/10.1007/s10725-018-00473-z>
- Jiang, Y., Wang, L., Lu, S., Xue, Y., Wei, X., Lu, J., & Zhang, Y. (2019). Transcriptome sequencing of *Salvia miltiorrhiza* after infection by its endophytic fungi and identification of genes related to tanshinone biosynthesis. *Pharmaceutical Biology*, 57(1), 760–769. <https://doi.org/10.1080/13880209.2019.1680706>
- Kage, U., Karre, S., Kushalappa, A. C., & McCartney, C. (2017). Identification and characterization of a fusarium head blight resistance gene *TaACT* in wheat QTL-2 DL. *Plant Biotechnology Journal*, 15(4), 447–457. <https://doi.org/10.1111/pbi.12641>
- Karlsson, I., Friberg, H., Kolseth, A., Steinberg, C., & Persson, P. (2017). Organic farming increases richness of fungal taxa in the wheat phyllosphere. *Molecular Ecology*, 26(13), 3424–3436. <https://doi.org/10.1111/mec.14132>
- Khare, E., Mishra, J., & Arora, N. K. (2018). Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments

- and Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2732. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02732>
- Kothe, E., & Turnau, K. (2018). Editorial: mycorrhizosphere communication: mycorrhizal fungi and endophytic fungus-plant interactions. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03015>
- Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., & Mishra, V. (2021). An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. *Plants*, 10(6), 1185. <https://doi.org/10.3390/plants10061185>
- Kwak, M.-J., Song, J. Y., Kim, S.-Y., Jeong, H., Kang, S. G., Kim, B. K., Kwon, S.-K., Lee, C. H., Yu, D. S., Park, S.-H., & Kim, J. F. (2012). Complete genome sequence of the endophytic bacterium *Burkholderia* sp. Strain KJ006. *Journal of Bacteriology*, 194(16), 4432–4433. <https://doi.org/10.1128/JB.00821-12>
- Lahrman, U., & Zuccaro, A. (2012). *Opprimo ergo sum* — evasion and suppression in the root endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 25(6), 727–737. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-11-0291>
- Larran, S., Simón, M. R., Moreno, M. V., Siurana, M. P. S., & Perelló, A. (2016). Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease. *Biological Control*, 92, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.002>
- Latz, M. A. C., Jensen, B., Collinge, D. B., & Jørgensen, H. J. L. (2018). Endophytic fungi as biocontrol agents: Elucidating mechanisms in disease suppression. *Plant Ecology & Diversity*, 11(5–6), 555–567. <https://doi.org/10.1080/17550874.2018.1534146>
- Lengai, G. M. W., & Muthomi, J. W. (2018). Biopesticides and their role in sustainable agricultural production. *Journal of Biosciences and Medicines*, 06(06), 7–41. <https://doi.org/10.4236/jbm.2018.66002>
- Li, J., Wu, H., Pu, Q., Zhang, C., Chen, Y., Lin, Z., Hu, X., Li, O. (2023). Complete genome of *Sphingomonas paucimobilis* ZJSH1, an endophytic bacterium from *Dendrobium officinale* with stress resistance and growth promotion potential. *Archives of Microbiology*, 205(4), 132. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03459-2>
- Lu, C., Liu, H., Jiang, D., Wang, L., Jiang, Y., Tang, S., Hou, X., Han, X., Liu, Z., Zhang, M., Chu, Z., & Ding, X. (2019). *Paecilomyces variotii* extracts (ZNC) enhance plant immunity and promote plant growth. *Plant and Soil*, 441(1–2), 383–397. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04130-w>
- Lu, H., Wei, T., Lou, H., Shu, X., & Chen, Q. (2021). A Critical review on communication mechanism within plant-endophytic fungi interactions to cope with biotic and abiotic stresses. *Journal of Fungi*, 7(9), 719. <https://doi.org/10.3390/jof7090719>
- Mahoney, A. K., Yin, C., & Hulbert, S. H. (2017). Community structure, species variation, and potential functions of rhizosphere-associated bacteria of different winter wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00132>
- Malinich, E. A., Wang, K., Mukherjee, P. K., Kolomiets, M., & Kenerley, C. M. (2019). Differential expression analysis of *Trichoderma virens* RNA reveals a dynamic transcriptome during colonization of *Zea mays* roots. *BMC Genomics*, 20(1), 280. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5651-z>
- Morales-Cedeño, L. R., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Loeza-Lara, P. D., Parra-Cota, F. I., De Los Santos-Villalobos, S., & Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiological Research*, 242, 126612. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126612>
- Pandey, V., Ansari, M. W., Tula, S., Yadav, S., Sahoo, R. K., Shukla, N., Bains, G., Badal, S., Chandra, S., Gaur, A. K., Kumar, A., Shukla, A., Kumar, J., & Tuteja, N. (2016). Dose-dependent response of *Trichoderma harzianum* in improving drought tolerance in rice genotypes. *Planta*, 243(5), 1251–1264. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2482-x>
- Pankievicz, V. C. S., Camilios-Neto, D., Bonato, P., Balsanelli, E., Tadra-Sfeir, M. Z., Faoro, H., Chubatsu, L. S., Donatti, L., Wajnberg, G., Passetti, F., Monteiro, R. A., Pedrosa, F. O., & Souza, E. M. (2016). RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Plant Molecular Biology*, 90(6), 589–603. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0430-6>
- Plett, J. M., & Martin, F. M. (2018). Know your enemy, embrace your friend: Using omics to understand how plants respond differently to pathogenic and mutualistic microorganisms. *The Plant Journal*, 93(4), 729–746. <https://doi.org/10.1111/tbj.13802>
- Qin, S., Feng, W.-W., Zhang, Y.-J., Wang, T.-T., Xiong, Y.-W., & Xing, K. (2018). Diversity of Bacterial Microbiota of Coastal Halophyte *Limonium sinense* and Amelioration of Salinity Stress Damage by Symbiotic Plant Growth-Promoting Actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), e01533-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01533-18>
- Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (2011). Living inside plants: Bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2011.04.004>
- Rojas, E. C., Jensen, B., Jørgensen, H. J. L., Latz, M. A. C., Esteban, P., Ding, Y., & Collinge, D. B. (2020). Selection of fungal

- endophytes with biocontrol potential against Fusarium head blight in wheat. *Biological Control*, 144, 104222. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104222>
- Saini, P., Verma, A., Tiwari, H., Mishra, V., & Gautam, V. (2024). Omics-Based Approaches in Studying Fungal Endophytes and Their Associated Secondary Metabolites. In B. P. Singh, A. M. Abdel-Azeem, V. Gautam, G. Singh, & S. K. Singh (Eds.), *Endophytic Fungi* (pp. 209–227). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-49112-2_10
- Sánchez-Vallet, A., Mesters, J. R., & Thomma, B. P. H. J. (2015). The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), 171–183. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu003>
- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D.-J., Thomma, B. P., & Mesters, J. R. (2013). Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *eLife*, 2, e00790. <https://doi.org/10.7554/eLife.00790>
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Del Carmen Orozco-Mosqueda, Ma., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Segmüller, N., Kokkelink, L., Giesbert, S., Odinius, D., Van Kan, J., & Tudzynski, P. (2008). NADPH oxidases are involved in differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 21(6), 808–819. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-6-0808>
- Sowa, S. W., Gelderman, G., Leistra, A. N., Buvanendiran, A., Lipp, S., Pitaktong, A., Vakulskas, C. A., Romeo, T., Baldea, M., & Contreras, L. M. (2017). Integrative FourD omics approach profiles the target network of the carbon storage regulatory system. *Nucleic Acids Research*, gkx048. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx048>
- Straub, D., Yang, H., Liu, Y., Tsap, T., & Ludewig, U. (2013). Root ethylene signalling is involved in *Miscanthus sinensis* growth promotion by the bacterial endophyte *Herbaspirillum frisingense* GSF30T. *Journal of Experimental Botany*, 64(14), 4603–4615. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert276>
- Sugawara, S., Mashiguchi, K., Tanaka, K., Hishiyama, S., Sakai, T., Hanada, K., Kinoshita-Tsujimura, K., Yu, H., Dai, X., Takebayashi, Y., Takeda-Kamiya, N., Kakimoto, T., Kawaide, H., Natsume, M., Estelle, M., Zhao, Y., Hayashi, K., Kamiya, Y., & Kasahara, H. (2015). Distinct characteristics of Indole-3-Acetic acid and phenylacetic acid, two common auxins in plants. *Plant and Cell Physiology*, 56(8), 1641–1654. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv088>
- Sun, S., Sidhu, V., Rong, Y., & Zheng, Y. (2018). Pesticide pollution in agricultural soils and sustainable remediation methods: a review. *Current Pollution Reports*, 4(3), 240–250. <https://doi.org/10.1007/s40726-018-0092-x>
- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>
- Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., Barac, T., Vangronsveld, J., & Van Der Lelie, D. (2009). Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 748–757. <https://doi.org/10.1128/AEM.02239-08>
- Tao, Y., Jia, C., Jing, J., Zhang, J., Yu, P., He, M., Wu, J., Chen, L., & Zhao, E. (2021). Occurrence and dietary risk assessment of 37 pesticides in wheat fields in the suburbs of Beijing, China. *Food Chemistry*, 350, 129245. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129245>
- Terblanche, J. S., Hoffmann, A. A., Mitchell, K. A., Rako, L., Le Roux, P. C., & Chown, S. L. (2011). Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures. *Journal of Experimental Biology*, 214(22), 3713–3725. <https://doi.org/10.1242/jeb.061283>
- Utturkar, S. M., Cude, W. N., Robeson, M. S., Yang, Z. K., Klingeman, D. M., Land, M. L., Allman, S. L., Lu, T.-Y. S., Brown, S. D., Schadt, C. W., Podar, M., Doktycz, M. J., & Pelletier, D. A. (2016). Enrichment of root endophytic bacteria from *populus deltoides* and single-cell-genomics analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(18), 5698–5708. <https://doi.org/10.1128/AEM.01285-16>
- Vahabi, K., Sherameti, I., Bakshi, M., Mrozinska, A., Ludwig, A., & Oelmüller, R. (2015). Microarray analyses during early and later stages of the *Arabidopsis/Piriformospora indica* interaction. *Genomics Data*, 6, 16–18. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.07.019>
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Vibhuti, M., Kumar, A., Sheoran, N., Nadakkakath, A. V., & Eapen, S. J. (2017). Molecular basis of endophytic *Bacillus megaterium*-induced growth promotion in *arabidopsis thaliana*: revelation by microarray-based gene expression analysis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(1), 118–130. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9624-z>
- Ważny, R., Rozpądek, P., Domka, A., Jędrzejczyk, R. J., Nosek, M., Hubalewska-Mazgaj, M., Lichtscheidl, I., Kidd, P., & Turnau, K. (2021). The effect of endophytic fungi on growth and nickel accumulation in *Noccaea hyperaccumulators*.

- Science of The Total Environment*, 768, 144666. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144666>
- Wei, W., Zhu, W., Cheng, J., Xie, J., Jiang, D., Li, G., Chen, W., & Fu, Y. (2016). Nox Complex signal and MAPK cascade pathway are cross-linked and essential for pathogenicity and conidiation of mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep24325>
- Weilharter, A., Mitter, B., Shin, M. V., Chain, P. S. G., Nowak, J., & Sessitsch, A. (2011). Complete genome sequence of the plant growth-promoting endophyte *Burkholderia phytofirmans* Strain PsJN. *Journal of Bacteriology*, 193(13), 3383–3384. <https://doi.org/10.1128/JB.05055-11>
- Yan, Y., Yang, J., Dou, Y., Chen, M., Ping, S., Peng, J., Lu, W., Zhang, W., Yao, Z., Li, H., Liu, W., He, S., Geng, L., Zhang, X., Yang, F., Yu, H., Zhan, Y., Li, D., Lin, Z., ... Jin, Q. (2008). Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(21), 7564–7569. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801093105>
- Yin, C., Mueth, N., Hulbert, S., Schlatter, D., Paulitz, T. C., Schroeder, K., Prescott, A., & Dhingra, A. (2017). Bacterial communities on wheat grown under long-term conventional tillage and no-till in the pacific northwest of the united states. *Phytobiomes Journal*, 1(2), 83–90. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-09-16-0008-R>
- Zhang, W., Wang, J., Xu, L., Wang, A., Huang, L., Du, H., Qiu, L., & Oelmüller, R. (2018). Drought stress responses in maize are diminished by *Piriformospora indica*. *Plant Signaling & Behavior*, 13(1), e1414121. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1414121>
- Zhao, C., Liu, B., Piao, S., Wang, X., Lobell, D. B., Huang, Y., Huang, M., Yao, Y., Bassu, S., Ciais, P., Durand, J.-L., Elliott, J., Ewert, F., Janssens, I. A., Li, T., Lin, E., Liu, Q., Martre, P., Müller, C., Peng, S., Peñuelas, J., Ruane, A. C., Wallach, D., Wang, T., Wu, D., Liu, Z., Zhu, Y., Zhu, Z., Asseng, S. (2017). Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(35), 9326–9331. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701762114>
- Zhou, J., Li, X., Huang, P.-W., & Dai, C.-C. (2018). Endophytism or saprophytism: Decoding the lifestyle transition of the generalist fungus *Phomopsis liquidambari*. *Microbiological Research*, 206, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.005>

Клеточное выращивание мяса: обзор предметного поля

С. А. Сухих¹, Е. В. Ульрих², С. Ю. Носкова¹, О. Б. Калашникова¹, О. О. Бабич¹

¹ Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, г. Калининград, Российская Федерация

² Калининградский государственный технический университет г. Калининград, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: В свете нарастающего глобального демографического роста, мясная индустрия сталкивается с проблемами в обеспечении достаточного уровня производства мясных продуктов, чтобы удовлетворить возрастающий мировой спрос. В этом контексте растительные белки и другие альтернативные источники белка представляют собой перспективные варианты для устойчивой замены животных белков. Особое внимание в последнее время уделяется разработке культивированного мяса.

Цель: комплексный анализ современного состояния и перспектив развития альтернативных источников белка, включая растительные белки и культивированное мясо, в контексте глобальных вызовов, связанных с необходимостью удовлетворения возрастающего спроса на мясные продукты при одновременном снижении негативного воздействия на окружающую среду и обеспечении устойчивости продовольственных систем.

Материалы и методы: Источники подбирали в базах данных Scopus, Web of Science, PubMed. Из 187 источников, релевантных по ключевым словам, 79 соответствовали критериям включения. Обзор предметного поля опирался на протокол PRISMA-ScR.

Результаты: Воссоздание мясной ткани представляет сложность из-за её комплексной структуры, включающей разнообразные клетки, внеклеточный матрикс, белки, питательные вещества и факторы роста, что ставит перед современной тканевой инженерией и 3D-культурой тканей определённые вызовы. Клеточное сельское хозяйство, производящее агропродукцию из клеточных культур, требует добавления питательной среды для обеспечения необходимых условий для пролиферации, дифференциации и созревания клеток. Различные типы клеток, включая стволовые и сателлитные клетки, используются для создания культивированного мяса, при этом ключевым аспектом является выбор клеток с высокой репродуктивной способностью.

Выводы: Выращивание мяса представляет собой технологический прорыв для мировой пищевой индустрии, предлагая решение проблем экологии, устойчивого развития, общественного здоровья и благополучия животных. Его широкое распространение в будущем ограничивается в основном недоступностью технологий, в то время как потенциальные потребители уже в значительной мере готовы принять эту инновацию.

Ключевые слова: культивированное мясо, клеточная инженерия, мультипотентные мезенхимные стволовые клетки, растительное мясо

Корреспонденция:
Станислав Алексеевич Сухих
E-mail: SSukhikh@kantiana.ru

Конфликт интересов:
авторы сообщают
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 23.10.2023

Принята: 15.03.2024

Опубликована: 30.03.2024

Copyright: © 2024 Авторы



Для цитирования: Сухих, С. А., Ульрих, Е. В., Носкова, С. Ю., Калашникова, О. Б., & Бабич, О. О. (2024). Клеточное выращивание мяса: обзор предметного поля. FOOD METAENGINEERING, 2(1), 51-67. <https://doi.org/10.37442/2024.1.40>

Cellular Meat Cultivation: A Scoping Review

Stanislav A. Sukhikh¹, Elena V. Ulrikh², Svetlana Yu. Noskova¹, Olga B. Kalashnikova¹, Olga O. Babich¹

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

² Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: Considering the increasing global demographic growth, the meat industry is facing challenges in ensuring a sufficient level of meat production to meet the increasing global demand. In this context, plant proteins and other alternative protein sources represent promising options for sustainable replacement of animal proteins. Special attention has recently been paid to the development of cultured meat.

Purpose: A comprehensive analysis of the current state and prospects for the development of alternative protein sources, including vegetable proteins and cultured meat, in the context of global challenges related to the need to meet the increasing demand for meat products while reducing the negative impact on the environment and ensuring the sustainability of food systems.

Materials and Methods: To write a review of the subject field, sources were selected in the databases Scopus, Web of Science, PubMed. Of the 187 keyword-relevant sources, 79 met the inclusion criteria. The review of the subject field was based on the PRISMA-ScR protocol.

Results: The reconstruction of meat tissue is difficult due to its complex structure, which includes a variety of cells, extracellular matrix, proteins, nutrients, and growth factors, which poses certain challenges to modern tissue engineering and 3D tissue culture. Cellular agriculture, which produces agricultural products from cell cultures, requires the addition of a nutrient medium to provide the necessary conditions for cell proliferation, differentiation, and maturation. Various cell types, including stem and satellite cells, are used to create cultured meat, with the key aspect being the selection of cells with high reproductive capacity.

Conclusions: Cultured meat has been a revolutionary technological advancement for the global food industry and has been seen as a potential answer to environmental, sustainability, public health and animal welfare concerns. The spread of cultured meat in the near future is limited only by the lack of available technologies, while widespread acceptance by potential consumers has almost been achieved.

Keywords: cultured meat; cell engineering; multipotent mesenchymal stem cells; plant-based meat

Correspondence:

Stanislav Alekseevich Sukhikh,
E-mail: SSukhikh@kantiana.ru

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 23.10.2023

Accepted: 15.03.2024

Published: 30.03.2024

Copyright: © 2024 The Author



To cite: Sukhikh S.A., Ulrikh E.V., Noskova S.Yu., Kalashnikova O.B., Babich O.O. Cellular meat cultivation: A Scoping Review. *FOOD METAENGINEERING*, 2(1), 51-67. <https://doi.org/10.37442/2024.1.40>

ВВЕДЕНИЕ

В 2022 году глобальное население достигло отметки в 8 миллиардов человек, несмотря на пандемические вызовы и мировой экономический кризис, подчеркивая прогнозы о его росте до 11.2 миллиарда к 2100 году (Ong, 2020; Desa, 2015). Это предполагает значительное увеличение потребления мяса, особенно в странах с развивающейся и переходной экономикой, в то время как промышленное животноводство оказывает давление на биоразнообразие и климат (Campbell, 2017), а высокое потребление мяса связано с риском развития онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний (Willett, 2019). В контексте стремления к устойчивому развитию и минимизации экологического воздействия мясной промышленности, которая требует значительных ресурсов земли и воды для производства кормов, научное сообщество исследует альтернативные подходы к мясному производству. Один из таких подходов — клеточное мясо, представляющее собой технологию, потенциально снижающую негативное влияние на окружающую среду и улучшающую благополучие животных, предоставляя при этом возможности для удовлетворения растущего спроса на мясные продукты (Shepon, 2018; Desa, 2015). Клеточное выращивание мяса является новым современным направлением альтернативного производства съедобной мышечной ткани животных (т.е. мяса), который приобретает вполне реальные очертания благодаря достижениям в области биотехнологии, клеточной и тканевой инженерии.

Первые патенты на производство искусственного мяса и мясоподобных продуктов из клеточного сырья были получены в США Ансоном, Педером и Боэром в 1956–1963 гг. В последующие годы в США, Японии, Великобритании возникла новая промышленность, производящая самые разнообразные искусственные мясные продукты, например, жареное, заливное, молотое и другое мясо разных видов, мясные бульоны, котлеты, колбасы, сосиски и другие мясoproductы (Rogov, 2013).

Уровень развития науки и практики культивирования клеток, тканевой инженерии, биотехнологии к началу XXI века достиг достаточно высокого уровня, и идея создания культурального мяса почти одновременно стала

очевидной для многих зарубежных стран, таких как Нидерланды, США, Австрия, Великобритания, Индия, Канада и др. (Post, 2012; Schmidinger, 2012) и российских исследователей (Рогов, 2012), и представителей бизнеса. Первые исследования, проведенные в России под руководством академика РАСХН Иосифа Александровича Рогова, позволили предложить оригинальный способ накопления клеток мышечной ткани с использованием отечественных разработок¹. Представляет интерес продолжить исследования в данном направлении, используя в качестве источника для наращивания клеточной биомассы мультипотентные мезенхимные стволовые клетки, выделенные из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота, т.к. стройной картины изучения проблематики пока нет.

В последние годы наблюдается рост количества исследований о приемлемости культивированного мяса потребителями, методах тканевой инженерии. Также большинство исследований в области культивированного мяса затрагивают моральную сторону этого вопроса. При этом остается малоизученным вопросы, связанные с развитием инновационной технологии производства культивированного мяса в России. Фрагментированными также являются знания в области стратегии получения культивированного мяса и особенностей потребления как культивированного мяса, так и продуктов на его основе (Ong, 2020; Willett, 2019; Arshad, 2017),

Основная задача данного обзора предметного поля заключается в детальном изучении текущего состояния и будущих возможностей альтернативных источников белка, таких как растительные белки и лабораторно выращенное мясо, в рамках решения глобальных задач. Последние включают удовлетворение растущего мирового спроса на мясо, минимизацию вредного влияния на окружающую среду и способствование устойчивому развитию продовольственных систем. Обзор нацелен на изучение передовых технологий в области производства альтернативного белка, анализ его влияния на экологию, экономику и общество, а также на исследование возможностей для интеграции этих инноваций в пищевую индустрию и рынок потребительских товаров.

¹ Рогов, И.А., Валихов, А.Ф., Демин, Н.Я., Кроха, Н.Г., Лисицын, А.Б., Семёнов, Г.В., Титов, Е.И., Тутельян, В.А., Рогов, С.И., & Эрнст Л.К. Пат. 2314719 Российская Федерация МПК7 C12N 5/06, A 23 L 1/31. Способ получения мясного продукта: заявитель и патентообладатель ФАО ГОУ ВПО Московский государственный университет прикладной биотехнологии. № 2006119540; заявл. 06.06.2006; опубл. 20.01.2008, бюл. №2.

С. А. Сухих, Е. В. Ульрих, С. Ю. Носкова, О. Б. Калашникова, О. О. Бабич

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол и заявление о прозрачности исследования

Обзор представляет собой прозрачный, точный и честный отчет о проведенном исследовании.

Критерии отбора

Объектами данного исследования являлись научные публикации российских и зарубежных авторов, касающиеся общих сведений и методов выращивания клеточного мяса в разных странах. В обзор предметного поля включены экспериментальные статьи, подходящие под критерии отбора. Критерии отбора в соответствии с Population, Concept, Context подходом представлены в Таблице 1.

Решение о включении или исключении публикации в обзор предметного поля принималось авторами на основе представленных критериев. Также дополнительным критерием являлось наличие доступа к полному тексту статьи. В случае отсутствия такого доступа полный текст работы запрашивался у авторов, если авторы работ не предоставляли доступ к тексту, то работа исключалась из обзора.

Стратегия поиска источников

Исследование литературы по теме культивированного мяса и связанных с ним аспектов проводилось через анализ публикаций в базах данных Scopus, Web of Science, PubMed, РИНЦ. Временной интервал охватывает период с начала 2005 года, когда появилась первая публикация по данной тематике, до середины 2023 года. Для анализа были отобраны обзорные и экспериментальные статьи, доступные в открытом доступе в Интернете и освещающие вопросы культивированного мяса, источников клеток для его производства, а также научные публикации, посвящённые обоснованию актуальности данной темы, изучению свойств и механизмов различных методов клеточного выращивания мяса и определению перспективных направлений исследований в этой области. Особое внимание было уделено работам, опубликованным за последние пять лет в рецензируемых научных журналах с высоким индексом цитирования, на английском и русском языках. Кроме того, в анализ включены материалы конференций и главы из научных книг. В PubMed проведён дополнительный поиск публикаций за период 2005–2023 гг., используя ключевые слова, такие как культивированное мясо, клеточная инженерия, мультипотентные мезенхимные стволовые клетки, растительное мясо и виды клеточного выращивания мяса.

Таблица 1

Критерии отбора источников

Критерий	Включено	Исключено	Причины
Концепция	Исследования, описывающие особенности потребления мяса, методы культивирования клеток для производства мясных культур	Исследования, не затрагивающие предметное поле исследований	Комплексный анализ современного состояния и перспектив развития методов получения альтернативных источников белка, включая растительные белки и культивированное мясо
Контекст	Исследования, направленные на развитие технологии производства культивированного мяса в России	Исследования, направленные на развитие технологии производства культивированного мяса в других странах	Наблюдается дефицит производства пищевого белка, в следствии стагнации скотоводства и снижения покупательской способности населения
Язык	Русский, английский	Все, кроме русского и английского	В связи с наибольшей доступностью статей на русском и английском языках
Временной период	до 01.07.2023	после 01.07.2023	Статьи были ограничены по временному так как в литературных источниках до 1990 года не обнаруживаются опубликованные обзоры по заданной теме
География	Развитые страны	Страны со слаборазвитой экономикой, невысоким уровнем жизни	В развитых странах наблюдается внедрение передовых технологий

Отбор источников

Результаты поиска анализировали и отбирали в соответствии с протоколом PRISMA-ScR. На первом этапе отбора научной литературы в рамках предметного поля исключали научные публикации из-за отсутствия доступа к полному тексту, а также исключали труды конференций, в силу фрагментированной информации. На втором этапе проводили скрининг с целью выявления публикаций с дублирующей информацией. В случае обнаружения — дубликаты исключались. Далее осуществляли анализ источников по названию и содержанию аннотаций. На последнем этапе проводили скрининг полного текста научных публикаций предыдущего этапа. Отобранные в результате многоэтапного скрининга научные публикации были включены в обзор предметного поля.

Извлечение и анализ данных

Из отобранных работ была извлечена следующая информация: имена авторов и информация о странах происхождения, цель и дизайн исследования, выводы, год публикации. Все включенные в обзор были проанализированы авторами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты поиска и процесс отбора

Из баз данных Scopus, Web of Science, PubMed, РИНЦ по первичному поисковому запросу были отобраны 187 потенциально приемлемых источника (Рисунок 1). Среди этих публикаций до начала исследований было исключено 16 публикаций: 6 — из-за отсутствия доступа к пол-

Рисунок 1

Процедура отбора источников для составления обзора предметного поля по PRISMA-ScR



ному тексту после запроса у авторов, 10 — из-за жанра публикации (труды конференций не включались в обзор). Далее скринингу было подвергнуто 152 работы, 30 из которых были исключены как дублирующие.

После анализа названий и аннотаций было исключено еще 4 исследования. В ходе дальнейшего скрининга полного текста статей, из 137 оставшейся статьи было исключено еще 58. В итоге в обзор предметной области было включено 79 исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Большинство отобранных публикаций являлись экспериментальными работами. Отобранные исследования были опубликованы в период с 2000 по 2023 год, из них 60,7 % статей было опубликовано в последние 5 лет. Наибольшее количество работ было опубликовано в 2019 году — 21,5 %.

Особенности потребления культивированного мяса

К 2050 году глобальное население достигнет 10 миллиардов человек, что потребует удвоения производства белка (Godfray, 2019). Несмотря на то, что мясо служит распространенным источником белка, традиционные методы его производства характеризуются высокой степенью неустойчивости (Godfray, 2019). В свете этого возникает насущная потребность в поиске альтернативных источников белка для обеспечения продовольственной безопасности в обозримом будущем. Альтернативные белки, в числе которых растительные белки, микопroteины, белки насекомых и продукты, полученные с помощью клеточного синтеза, представляют собой направление к сокращению зависимости от продуктов животного происхождения (Sexton, 2019). Клеточное сельское хозяйство, представляющее собой производство сельскохозяйственных продуктов на основе клеточных культур, отличается от других видов альтернативного производства белка стремлением создавать продукты, «биологически эквивалентные» традиционным изделиям животноводства (Allan, 2019; Bhat, 2019; Stephens, 2018). Последние годы отмечены возрастающим интересом к производству мяса на клеточной основе (National Academies of Sciences, 2017), обусловленным восприятием таких продуктов как более здоровой, экологически чистой и устойчивой альтер-

нативы существующим методам сельскохозяйственного производства (Shepon, 2018). Стартапы и исследовательские группы достигли значительного прогресса в разработке клеточных линий, оптимизации условий культивации (Ding, 2018), создании съедобных каркасов (Enrione, 2017), разработке производственных платформ (Fish, 2020) и представлении прототипов продукции для дегустации (O'Riordan, 2017). Некоммерческие организации, включая Good Food Institute (GFI) и New Harvest, провели ряд научных исследований, а также организовали конференции и встречи для обсуждения социальных последствий, экономической осуществимости и вопросов регулирования безопасности продуктов питания на клеточной основе (Waschulin, 2018). Исследования, посвященные анализу потребительского восприятия, указывают на необходимость улучшения текстурных характеристик мяса на клеточной основе (Bhat, 2019; Szejda, 2018).

Растительное и культивированное мясо — это две важные технологии, которые могут удовлетворить потребительский спрос на мясо, избегая при этом этических, экологических проблем и проблем общественного здравоохранения, связанных с традиционным производством мяса (Bryant, 2021; Ismail, 2020). Однако белковые продукты на растительной основе содержат недостаточное количество незаменимых аминокислот и микроэлементов, из-за того, что создать продукт, имитирующий питательную ценность мяса, сложнее (Fraeye, 2020).

Различные стволовые клетки, включая мышечные стволовые клетки (также известные как сателлитные клетки) или эмбриональные стволовые клетки, могут использоваться для производства культивированного мяса. Культивирование мышечных стволовых клеток можно разделить на две фазы: пролиферацию и дифференцировку (Tuomisto, 2019). Фаза пролиферации предназначена для достижения максимального числа клеток (Dupont, 2020). В фазе дифференцировки мышечные стволовые клетки подвергаются миогенезу, во время которого мышечные стволовые клетки развиваются в клетки скелетных мышц (Bryant, 2018, Crosser, 2020, Reiss, 2021).

Несмотря на достижения в тканевой инженерии и трехмерной культуре тканей, воспроизвести мясную ткань сложно из-за сложного расположения различных клеток, внеклеточного матрикса, белков, питательных веществ и факторов роста (Ding, 2018, Handral, 2020). Очевидно, что осведомленность и опыт дегустации

увеличили бы шансы на признание культивированного мяса, и информация о личных преимуществах культивированного мяса стала бы более приемлемой, чем качество и вкус. В недавнем опросе 58 % респондентов заинтересованы платить больше за культивированное мясо, и в среднем 37 % респондентов готовы рассматривать цену на обычное мясо для выращивания культивированного мяса (Morais-da-Silva, 2022, Weinrich, 2020).

Исследование, проведенное Weinrich et al. (2020), показало, что более половины (57 %) немецких потребителей открыты к пробе культивированного мяса, при этом треть из них (30 %) готовы включить его в свой регулярный рацион. В сравнении, бельгийские потребители продемонстрировали более низкую готовность к акцептации культивированного мяса, с диапазоном от 23.9 % до 42.5 %, в зависимости от полученной информации. Также, Mancini и Antonioli (2019) выявили, что 54.5 % итальянских потребителей выразили интерес к испытанию культивированного мяса.

Изучение факторов, влияющих на приемлемость культивированного мяса, выявило различные подходы в исследованиях. В целом, среди ключевых тенденций были выделены пищевая неофобия и отвращение к пище, играющие значительную роль в определении готовности к потреблению культивированного мяса. Помимо этого, было отмечено, что возраст и пол могут оказывать влияние на акцептацию культивированного мяса в одних исследованиях (Morais-da-Silva, 2022), тогда как в других эти факторы не имели значимого воздействия на предпочтения потребителей (Mancini, 2019). Кроме того, уровень образования не влиял на готовность участников к покупке культивированного мясного бургера (Wilks, 2019) или их интерес к употреблению культивированного мяса (Slade, 2018), что указывает на сложность факторов, влияющих на потребительские предпочтения в отношении новых продуктов питания.

Методы клеточного выращивания мяса

Процесс выращивания тканевого мяса начинается с приобретения желаемых типов клеток или тканей. Поскольку зрелые клетки скелетных мышц не обладают способностью к пролиферации, стволовые клетки (мезенхимальные) являются наиболее распространенным первичным источником миопрогениторов. Несмотря на наличие некоторых ограничений в отношении их регенерационного потенциала, который связаны только

с незначительными повреждениями (Witt, 2017), регенеративные способности этих стволовых клеток (сателлитных клеток) и их потенциал к пролиферации и дифференцировке представляют собой важную основу для инженерии ткани скелетных мышц (Shepon, 2018).

Различные типы клеток, в частности стволовые клетки, могут использоваться в качестве источника материала для производства клеточного мяса (Crosser, 2020, Warner, 2019). Для роста клеток в культуре необходимы питательные вещества, подобные клеткам живой ткани. В отсутствие кровоснабжения, обеспечивающего питательные вещества (и удаляющего отходы), клетки погружаются в культуральную среду, которая обеспечивает важные питательные вещества и факторы роста. Факторы роста, необходимые для пролиферации, дифференциации и созревания, обычно предоставляются путем добавления от 10 % до 20 % питательной среды (Stephens, 2018).

Среда для культивирования должна быть разработана таким образом, чтобы обеспечить высокую скорость роста клеток не только с соответствующим уровнем питательных веществ, но и с соответствующими миогенными регуляторными факторами роста и гормонами (Rubio, 2019). Следует отметить, что пролиферация (увеличение количества клеток) возможна только на стадии сателлитных клеток и стадии моноклеарных миобластов (Stephens, 2019). Миотрубки (многоядерные слитые миобласты) и миофибры (многоядерные зрелые мышечные клетки) не пролиферируют и, следовательно, важна экстенсивная и быстрая пролиферация на стадиях стволовых клеток и миобластов (Weinrich, 2020). Традиционно стволовые клетки культивируются в среде, содержащей питательные вещества и сыворотку эмбриона быка, и точный состав этой сыворотки не определен (Handral, 2020, Morais-da-Silva, 2022). Культивирование клеток *in vitro* обычно проводится в асептической среде из-за риска заражения, которое может привести к бактериальному заражению и гибели клеток (Mancini, 2019). Бензоат натрия — распространенный консервант, добавляемый в мясные продукты (Allan, 2019). Кроме того, антибиотики часто добавляют в среду для выращивания клеток в долгосрочной культуре, чтобы предотвратить заражение бактериями (O’Riordan, 2017). В патентах на промышленное производство мяса на основе клеток указывают, что процесс будет осуществляться без антибиотиков (или гормонов) (Slade, 2018).

Первым шагом в рабочем процессе производства мясных культур является поиск клеток, что может быть

С. А. Сухих, Е. В. Ульрих, С. Ю. Носкова, О. Б. Калашникова, О. О. Бабич

достигнуто двумя способами (Witt, 2017). Существует несколько подходов к производству культивируемого мяса с различными типами клеток исходного сырья (эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и сателлитные клетки (СК))¹. Сателлитные клетки, также называемые стволовыми мышечными клетками крупного рогатого скота, кажутся наиболее простыми и подходящими кандидатами для этой цели (Eibl, 2021). Это мононуклеарные клетки, которые можно найти между базальной мембраной и сарколеммой близлежащих мышечных волокон в скелетных мышцах млекопитающих. Они участвуют в регенерации скелетных мышц и обладают способностью размножаться, сохраняя при этом свои стволовые свойства (Thorrez, 2019). Когда активируются определенные сигнальные пути, они могут дифференцироваться в мышечные клетки (Burton, 2000). В настоящее время требуется всего несколько миллиграммов мышц, чтобы изолировать достаточное количество клеток для начала культивирования (Reiss, 2021).

3D-печать культивированного мяса — это новая технология (CROSSER, 2020). Несмотря на отсутствие доказа-

тельств устойчивости выращивания мяса (Ismail, 2020), 3D-печать выращенного мяса, несомненно, обеспечивает гибкость мясных продуктов, поскольку они могут быть изготовлены с питательной ценностью для определенных групп потребителей и создавать уникальные текстуры и формы (Handral, 2020).

3D-печать сложна и отличается от выращивания одного только мяса, поскольку она печатает мышечные клетки, жировые клетки и даже поддерживающие клетки внеклеточного матрикса внутри каркаса, который поддерживает рост и пролиферацию клеток (Helliwell, 2021). После процесса печати мясо будет подвергаться дальнейшей выдержке, обычно в биореакторах, обеспечивающих транспортировку питательных веществ. Напротив, только выращенное мясо (без 3D-печати) производится путем размножения мышечных клеток и прикрепления их к каркасу или носителю перед переносом в подходящий биореактор со средой для выращивания (Kikuchi, 2018). Возможности этого метода по своей природе ограничены, поскольку невозможно производить мясо с высокой структурой, такое как стейки¹. Характеристики описанных методов представлены в Таблице 1.

Таблица 1

Достоинства и недостатки методов клеточного выращивания мяса.

Метод клеточного выращивания мяса	Достоинства	Недостатки	Источники
Из стволовых клеток in vitro	Способность к полификации и дифференцировке	Низкий регенерационный потенциал	(Handral, 2020, Ismail, 2020)
Из мышечных клеток in vitro	Рост на культуральных средах, которые обеспечивают клетки питательными веществами и факторами роста	Невозможность совместного культивирования	(CROSSER, 2020, Warner, 2019)
Из жировых клеток in vitro			(Morais-da-Silva, 2022)
Из соединительной ткани in vitro			(Morais-da-Silva, 2022)
Из сателлитных клеток in vitro	Содержат миотрубки и миофибры — многоядерные зрелые мышечные клетки	Низкая полификация	(Godfray, 2019, Willett, 2019)
Из резистентных клеток в биореакторе	Способность к дифференцировке	Низкая полификация	(Slade, 2018, Warner, 2019)
Из мононуклеарных клеток in vitro	Участие в регенерации скелетных мышц	Излишне быстрая дифференцировка	(Bonny, 2015)
Методом 3D-печати	Быстрая печать клеток, хорошая полификация	Невозможность производить мясо со сложной структурой	(Bonny, 2015, Bryant, 2021, Morais-da-Silva, 2022)

¹ Plant-based and cell-cultured 'meat' labeling under attack in 25 states. <https://www.foodnavigator-usa.com/Article/2019/05/29/Plant-based-and-cell-cultured-meat-labeling-under-attack-in-25-states>

Источники клеток для производства мясных культур

Методика создания культивируемых мышечных тканей из стволовых клеток была описана давно, но еще не разработана для коммерческого производства культивируемых мясных продуктов (Shaikh, 2021). Последние достижения в технологиях культивирования тканей позволяют предположить, что производство может быть экономически целесообразным при условии, что его продукты переработки повторяют физические свойства с точки зрения цвета, вкуса, аромата, текстуры и вкусовых качеств, сравнимые с обычным мясом (Hoang, 2016, Warner, 2019).

Для производства клеточного мяса необходимо идентифицировать и получать клетки с большой способностью к размножению. В идеале эти клетки обладают способностью к самообновлению и могут бесконечно продолжать делиться, в этом и заключается первая проблема. Миогенез начинается после формирования эмбриона, продолжается на протяжении всей жизни плода и в основном завершается при рождении (Szejda, 2018). При рождении все мышечные клетки (волокна) в мышечной ткани полностью сформированы, при этом основные изменения во время роста и созревания животного заключаются в изменении ширины мышечных клеток (гипертрофия) и некоторых типов мышечных волокон (Tomiyama, 2020). Мышечные волокна многоядерные, являются результатом слияния одноядерных миобластов. В ткани скелетных мышц животных миосателлитные стволовые клетки располагаются сразу за мышечной клеткой, между сарколеммой и базальной мембраной и обычно находятся в состоянии покоя (не делятся) (Warner, 2019). При стимуляции, например, при повреждении мышечных клеток, эти сателлитные клетки могут делиться и давать новые ядра. Эти новые ядра, однажды сформировавшись, затем переносятся из внеклеточного во внутриклеточное пространство мышечной клетки. Большая часть миогенеза происходит во время развития эмбриона и плода, но миогенез также может происходить за счет привлечения миосателлитных клеток для регенерации мышц после травмы или в качестве адаптации к рабочей нагрузке (Ben-Arye, 2019, Bodiou, 2020). По мере старения организма регенеративный потенциал популяции миосателлитов быстро снижается, отсюда и предпочтение собирать миосателлитные клетки у новорожденных животных (O'Neill, 2021).

Процесс производства культивируемого мяса начинается с иссечения небольшого кусочка ткани у живых животных, что делается с помощью небольшой биопсии под анестезией. Культивирование клеток скелетных мышц из сателлитных клеток может осуществляться в фазах пролиферации и дифференцировки (Bryant, 2021). Вкратце, на стадии пролиферации стволовые клетки сначала отделяются от тканей, а затем клетки развиваются в другую новую мышечную ткань. Как правило, сами стволовые клетки обладают способностью к самообновлению, так что они могут создавать новую мышечную ткань самостоятельно при наличии доступных факторов роста (Wilks, 2019). Клетки культивируются в определенных жидких средах, содержащих некоторые определенные питательные вещества (в зависимости от вида клеток и типа ткани), которые обеспечивают условия, необходимые для роста тканей. Процесс пролиферации удваивает популяцию за 7–8 недель, и этот процесс продолжается в биореакторах до тех пор, пока не будут произведены триллионы клеток (Stephens, 2018).

Стадия дифференцировки наступит, когда будет произведено достаточное количество клеток. Клетки-сателлиты дифференцируются, когда в среде отсутствуют факторы роста (Crosier, 2020). Затем клетки сливаются и естественным образом образуют мышечные трубки. Впоследствии они будут погружены в коллагеновый гель с центральной втулкой, расположенной в середине чашки для культивирования, для образования мышечного волокна в форме пончика диаметром 1 мм. Врожденная склонность мышечных клеток к сокращению является мощным стимулом для созревания мышц и производства белка. На производство этого мышечного волокна уходит всего три недели, а для приготовления 85 г гамбургера потребуется 10,000 мышечных волокон (Stephens, 2018). Это культивируемое мясо считается более безопасным, чем другие виды мясных аналогов, поскольку оно не содержит аллергенных веществ, таких как мясо на растительной основе. Более того, здоровое мясо можно получить, заменив насыщенные жирные кислоты полезными полиненасыщенными жирными кислотами. Однако удаление фетальной бычьей сыворотки и антибиотика из культуральной среды необходимо для того, чтобы культивируемая говядина стала устойчивой и приемлемой (Stephens, 2018).

Существует два возможных источника клеток для производства мяса *in vitro*: первичные клетки, выделенные

С. А. Сухих, Е. В. Ульрих, С. Ю. Носкова, О. Б. Калашникова, О. О. Бабич

из исходной ткани, или установленные клеточные линии, полученные непосредственно из нативной опухолевой ткани или искусственно созданные из первичных клеток *in vitro* (Burton, 2000). Последнее может быть достигнуто двумя способами. Типичная стратегия включает генетическую или химическую индукцию, которая перепрограммирует клетки для неограниченной пролиферации (Willett, 2019). Другой метод — отобрать клетки, прошедшие спонтанную трансформацию и ставшие бессмертными, а затем продолжить культивирование только выбранных субклонов (Burton, 2000). Эти иммортализованные клетки (т.е. непрерывные клеточные линии) уже оказались полезным альтернативным источником свежих образцов тканей, и они могут быть ценными инструментами для увеличения скорости пролиферации и дифференцировки (Burton, 2000, Rorheim, 2016).

Тем не менее, поскольку они претерпели значительные мутации, чтобы стать бессмертными, потенциальные последствия этих процессов необходимо оценивать с особой осторожностью. Более того, эти клетки могут генетически изменяться в течение нескольких пассажей, что приводит к фенотипическим различиям между изолятами и потенциально ошибочной идентификации. Одно общее ограничение также может заключаться

в том, что они не всегда являются репрезентативными для первичных клеток. Например, они могут показывать разные темпы роста; следовательно, данные ячеек следует интерпретировать с осторожностью (Burton, 2000).

Сравнительные характеристики описанных в исследованиях ученых методов клеточного выращивания мяса представлены в Таблице 2.

Развитие технологии производства культивированного мяса в России

Поскольку рыба и биоресурсы являются важнейшими в питании населения России, рыбная и мясная промышленность еще долгие годы будет являться одной из важнейших составляющих пищевой отрасли. В то же время развитие технологий вплотную приблизило Россию к той черте, за которой самостоятельное восстановление биоресурсов будет невозможно, если человечество продолжит потреблять их в тех же объемах. Настало время думать не только о том, как увеличить использование биоресурсов (в основном, мяса и рыбы), но и о том, как их преумножить и сохранить (Onwezen, 2020).

В России, как и в других развивающихся странах, существует дефицит производства пищевого белка, причи-

Таблица 2

Сравнительные характеристики описанных в исследованиях ученых методов клеточного выращивания мяса

Метод клеточного выращивания мяса	Достоинства	Недостатки	Источники
Одновременное выращивание всех типов клеток и управление ими	Получение полноценного мяса с высокой структурой	Усложняет целевой продукт, увеличивает технические проблемы его производства	(Specht, 2018)
Сателлитные клетки	Используются для регенерации мышц после травмы или в качестве адаптации к рабочей нагрузке	Сложные процессы выделения, культивирования и поддержания высококачественной популяции, быстрое старение	(Hoang, 2016, Lynch, 2019)
Миобласты, миоциты	При повреждении мышечных клеток, эти клетки могут делиться и давать новые ядра	Необходимость сеять, поливать, удобрять, собирать и обрабатывать клетки, забивать	(Godfray, 2019, Lynch, 2019, Willett, 2019)
Стволовые клетки	Способность развиваться во множество различных типов клеток в организме, и все стволовые клетки могут самообновляться	Низкая дифференцировка	(Lynch, 2019, Rorheim, 2016)
Адиipoциты и фибробласты	Устойчивость культивированного мяса, все процессы протекают как внутри клетки	Невозможность совместного культивирования	(Bryant, 2021, Crosser, 2020, O'Neill, 2021)
3D-печать	Быстрая печать клеток, хорошая пролиферация	Невозможность производить мясо с высокой структурой	(Chriki, 2020, Gholobova, 2018, Ismail, 2020, Morais-da-Silva, 2022)

нами которого являются последствия продолжавшейся почти двадцать лет стагнации скотоводства и снижение покупательской способности населения. На каждого жителя страны в 2013 г. Было произведено около 15.5 кг белка при норме 20.4 кг в год. За последние годы происходит удорожание производства полноценных белков в России (в 3–6 раз), основным поставщиком которого является животноводство и птицеводство. Проблему сокращения дефицита полноценного белка возможно решить благодаря созданию альтернативных методов его получения (Lisitsyn, 2019).

Первые исследования, проведенные в России, позволили предложить оригинальный способ накопления клеток мышечной ткани (Lisitsyn, 2019). В развитие полученных результатов учеными Московского государственного университета пищевых производств, Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени Я. Р. Коваленко, Всероссийского научно-исследовательского института мясной промышленности им. В. М. Горбатова Россельхозакадемии были продолжены научно-исследовательские работы по созданию перспективных методов получения культурального мяса и формированию молодых научных кадров, способных работать на стыке таких наук как биология, биотехнология, технология мяса и мясных продуктов, клеточная и тканевая инженерия.

В настоящее время путем направленной миодифференцировки мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) *in vitro* получена биомасса, состоящая из клеток мышечной ткани. Для этих целей из костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ) крупного рогатого скота (КРС) были выделены и охарактеризованы клеточные популяции с фенотипом, подобным ММСК. Установлено, что ММСК, выделенные как из КМ, так и из ЖТ КРС, способны формировать клетки жировой, костной и мышечной тканей при культивировании в индукционных средах *in vitro* (Gholobova, 2018, Lisitsyn, 2019). Полученная биомасса клеток мышечной ткани представляет интерес, прежде всего, как источник полноценного белка (Kenigsberg, 2020).

Петровым и др. (Petrov, 2017) проведены исследования, в результате которых разработан экспериментальный образец биореактора для получения мяса *in vitro* как полноценного белка и экспериментальный образец системы управления им, создана система для управления технологическим процессом получения мяса *in vitro* как полноценного белка в биореакторе. Предложенное техни-

ческое средство для культивирования стволовых клеток в двухкамерном устройстве обеспечивает оптимальные параметры для их роста в автоматизированном режиме и предназначено для использования в исследовательских лабораториях, ветеринарии, животноводстве, биотехнологической промышленности, а также в медицине.

В России на федеральном уровне большое внимание уделяется изучению биологии ММСК человека и их использованию в качестве биомедицинского клеточного продукта (Федеральный закон от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах»). В свою очередь, исследование культур ММСК различных видов животных, в том числе сельскохозяйственных, способствует разрешению многих вопросов, связанных со стандартизацией протоколов получения и культивирования данных клеток для использования в доклинических исследованиях регенеративной медицины. Создание новейших материалов в сочетании с уникальными свойствами ММСК также обеспечивает возможность осуществления достижений в области различных отраслей биотехнологии, регенеративной, ветеринарной медицины, а также углубления и расширения уже накопленных знаний (Zhang, 2020).

ММСК, выделенные из КМ и ЖТ КРС, депонированы в Специализированную Коллекцию перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных при ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии (СХЖ РАСХН) под №79 и №80, соответственно. Получено положительное решение о выдаче патентов РФ по заявкам № 2011149133/10 (073706) и № 2011149132/10 (073705) от 02.12.2011 г. Представленная научно-исследовательская работа закладывает основы будущей биотехнологии получения мяса *in vitro* в промышленном масштабе. Методика получения и культивирования ММСК сельскохозяйственных животных отработана и используется в секторе стволовой клетки ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии, а также на кафедре «Технология мяса и мясных продуктов» ФГБОУ НПО МГУПП в научно-исследовательской работе (Zhang, 2020).

В конце 2019 года в России вырастили искусственное мясо. Разработкой занимался Очаковский комбинат пищевых ингредиентов. Полученные 40 грамм говядины из чашки Петри экспериментаторы оценили в 900 тыс. рублей. При растущем спросе на культивированное мясо в России планируется, что к 2025 году лабораторная говядина появится в магазинах по приемлемым ценам (Rudenko, 2022).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценка литературных источников показала, что перспективность идеи создания культивированного мяса была известна многим зарубежным и российским исследователям и представителям компаний практически одновременно. Поэтому в июне 2007 года состоялся международный семинар по производству искусственного мяса с участием ученых из Норвегии, Германии, Израиля, Голландии, Португалии и Бельгии. Журнал Time назвал производство клеточного мяса одной из 50 прорывных идей XXI века (Dupont, 2022).

Исследования современной литературы показали, что рост мирового производства натурального мяса будет усугублять связанные с этим проблемы, такие как неэффективное использование энергии, труда, кормов и воды на единицу продукции (Carper, 2011). Кроме того, известно, что будет увеличиваться и экологическая нагрузка. Выбросы будут увеличивать загрязнение почвы, воды и воздуха, а выращивание кормовых культур будет увеличиваться за счет вырубки лесов (Cederberg, 2011). Кроме того, чрезмерное потребление мяса и животных жиров может привести к сердечно-сосудистым, желудочно-кишечным и онкологическим заболеваниям, в итоге ухудшающим качество жизни людей и потенциально приводящим к смерти (Clemente-Suárez, 2023). Нельзя исключать токсические инфекции и отравления, связанные с употреблением мяса, а также появление штаммов бактерий, устойчивых к антибиотикам (Marlow, 2009).

Современное состояние мировой продовольственной проблемы обусловлено, прежде всего, крайне неравномерным распределением производства и потребления продуктов питания между различными регионами, странами и группами населения мира. Более 60% населения мира испытывает хронический дефицит полноценного животного белка. В условиях современной научно-технической революции люди пытаются решить проблемы питания за счет повышения продуктивности животноводства, птицеводства и рыболовства, а также за счет совершенствования технологий переработки существующего сырья и более эффективного его использования (FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO, 2023). Однако, неизбежно будут разработаны новые методы и способы получения полноценных животных белков. Эти методы включают в себя новые методы культивированной *in vitro* мышечной ткани из клеток домашнего скота. Новые методы производства клеточного мяса помогут

преодолеть вышеупомянутые противоречия, присущие традиционным технологиям (Balasubramanian, 2021).

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что производство клеточного мяса занимает минимальные производственные площади, не трудоемко и совершенно не зависит от климатических, географических и сезонных факторов (Rodríguez, 2021). Технологии клеточного выращивания позволяют производить разнообразную искусственную мясную продукцию, в том числе продукты детского, лечебного и профилактического питания. Потребление и свойства культивированного мяса также можно широко регулировать, например, путем изменения параметров технологического процесса. Преимуществом является стандартизация сырья, состава, структуры, технологии и потребительских характеристик клеточных мясных продуктов, позволяющая исключить ручной труд на производстве, автоматизировать его и наладить рынок сбыта. Например, при производстве искусственных мясных продуктов (без туш, излишков жировой ткани и костей) обвалка не обязательна, а использование отходов, контроль качества, сортировка и т.д. со временем становятся ненужными, что является привлекательным для квалифицированных сотрудников и бизнеса. Авторами обзора установлено, что использование клеточного мяса и мясных продуктов значительно снизит затраты и облегчит организацию снабжения и питания в районах, где традиционное производство, распределение и хранение продуктов питания затруднено (Treich, 2021). При этом учитывается автоматическая упаковка искусственных мясных продуктов, удобство хранения и транспортировки сырья, удобство организации питания работников в отдаленных районах Севера, в море и в космосе. Основываясь на этом обзоре, мы хотели бы отметить, что взаимосвязь между традиционными и новыми методами производства мяса — это не противостояние, а, скорее, одновременное и дополняющее развитие и использование (Dupont, 2022; Awang, 2023).

Обзор позволил изучить исследования в этой области, которые были направлены на получение клеточно-выращенных продуктов, имитирующих традиционные изделия из рубленого мяса (технология сравнительно проста, продукты дешевы и удобны для использования) и нерубленые мясопродукты волокнистой структуры, т.е. одну из наиболее дорогих форм пищи (Treich, 2021).

Показано, что культивированное мясо благодаря быстрому развитию методов клеточной инженерии, ста-

новится новым способом получения богатых белком продуктов животного происхождения. В настоящее время это мясо не является заменой традиционного мяса животных. Это становится перспективным новым направлением на стыке многих дисциплин. Конечным результатом исследований в области производства мяса *in vitro* является производство мышечной ткани из клеток крупного рогатого скота (Awang, 2023).

Анализируя литературу по этой теме, выяснилось, что авторы публикаций выделяют примерно девять групп ученых во всем мире, работающих над проблемой производства, культивированного мясного. Голландские ученые ведут дальнейшие успешные исследования в этом направлении. Они активно представляют свои исследования в научной литературе, представляют результаты на телевидении и в интернете. Правительство Голландии также предоставляет мощную финансовую поддержку для развития направлений культивирования клеточного мяса. В 2023 году на научные и практические разработки выделено около 2 миллионов евро (Santos, 2023). Современные исследования клеточного мяса в США выросли из экспериментов NASA, где ученые уже давно пытаются найти лучшие способы питания космонавтов. До настоящего времени обширные исследования по этому вопросу проводились под руководством профессора В.А. Миронова из медицинского университета в Южной Каролине и профессора МакФарланда из университета Южной Дакоты США (Edelman, 2005). В России по данным Московского государственного университета пищевых производств и Всероссийского научного центра экспериментальной ветеринарной медицины имени Ю.Р. Коваленко РАСХН, под руководством академика РАСХН И.А. Рогова ведутся научные работы по изучению способов получения культивированного мяса (Рогов, 2012).

В Голландии над темой создания культивированного мяса работают ведущие учёные страны. Среди основных можно отметить команду учёных под руководством Марка Поста (Маастрихтский Университет). Этими вопросами также занимаются ученые под руководством профессора Утрехтского университета Хенка Хаагсмана и под руководством профессора Эдельмана (Университет Вагенингена). Интересно отметить, что ученые группы профессора Эдельман тесно сотрудничают по этому вопросу с университетами Южной Дакоты и Южной Каролины. Например, в университете Утрехта ведутся работы с культурами клеток, в том числе стволовыми,

а в университете Эйндховена разрабатываются биореакторы для наращивания культурального мяса в больших масштабах (Hong, 2021).

Согласно анализу литературных источников, в настоящее время существует несколько вариантов получения культивированного мяса (Basile, 2010). Первый вариант — выращивание клеток мышечной ткани животных или рыб в коллагеновой матрице и на питательной среде с добавлением бычьей сыворотки в чашках Петри или цилиндрическом контейнере. Второй вариант — получить большое количество клеток мышечной ткани (в ферментере) с внесением дополнительного количества аминокислот, витаминов и других питательных веществ (Awang, 2023). Третий вариант — монослойное культивирование миобластов в среде, содержащей фунгизон. Сутью этого подхода является дифференциация фибробластов, которые обычно встречаются в культурах миобластов и мешают процессу их дифференцировки. Полученные миобласты помещают в индукционную среду, и миотубы начинают формироваться через 6–8 дней (Lee, 2021).

Основная проблема выращивания клеточного мяса — выбор типа клеток, оценка их преимуществ и недостатков. Это могут быть эмбриональные клетки, клетки-сателлиты, стволовые клетки мышечной ткани взрослых животных или стволовые клетки головного мозга. Стволовые клетки являются перспективными из-за их способности делиться бесконечно и генерировать множество клеток различных тканей животных *in vitro*. Способность эмбриональных стволовых клеток к самостоятельному воспроизводству не ограничена. Они могут дифференцироваться и образовывать клетки любых мышечных тканей *in vitro* (Shaikh, 2021).

Однако наш обзор не охватил всего объема существующих проблем с эмбриональными стволовыми клетками для производства мяса, которые включают в себя риск неконтролируемой пролиферации и дифференцировки, а также этические вопросы об использовании этого типа клеток. Необходимо также осветить проблемы использования собственных стволовых клеток мышечной ткани — сателлитных клеток, заключающуюся в том, что они запрограммированы на направленную дифференцировку только в клетки мышечной ткани. У данного типа клеток ограниченный пролиферативный потенциал, а также они способны дифференцироваться только в один тип клеток. В последующих работах необходимо изучить прогнозируемое учеными большое будущее

для мезенхимных стволовых клеток в связи с их основными свойствами и признаками. Объем и задачи данного обзора не позволили также обсудить проблему спонтанной дифференцировки *in vitro* стволовых клеток взрослого организма. Несмотря на перечисленные недостатки представленного обзора, авторам удалось обсудить некоторые особенности и методы клеточного выращивания и потребления культивируемого мяса. Были выдвинуты гипотезы развития технологий клеточного выращивания мяса в России. Авторы коснулись перспективной темы исследования возможных источников клеток для получения культивируемого мяса. Тенденции решения данных вопросов будут представлены в будущих обзорах предметного поля о специфике клеточного выращивания мяса

ВЫВОДЫ

В современном мире растущий спрос на альтернативные источники белка подчеркивает важность развития технологий культивированного мяса. Производство мяса через клеточное культивирование предлагает возможность уменьшения зависимости от традиционного животноводства, однако сталкивается с техническими сложностями, связанными с воспроизведением сложной структуры мясной ткани. Использование различных типов стволовых клеток и разработка условий для их роста в культуре открывают новые перспективы для этой области. Внедрение 3D-печати в производство культивированного мяса расширяет возможности создания продуктов с уникальными питательными и тек-

стурными характеристиками, адаптированными к нуждам различных групп потребителей.

Тем не менее, для реализации потенциала клеточного выращивания мяса требуются дополнительные исследования, направленные на оптимизацию методов культивирования и изучение влияния различных условий на характеристики конечного продукта. Вклад научного сообщества через проведение широкомасштабных исследований способен способствовать прогрессу в данной области, обеспечивая разработку экологически устойчивых и питательных альтернатив традиционному мясу, что в свою очередь будет способствовать удовлетворению глобальных продовольственных потребностей.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Сухих Станислав Алексеевич: разработка методологии исследования, проведения исследований.

Ульрих Елена Викторовна: написание-рецензирование и редактирование рукописи.

Носкова Светлана Юрьевна: программное обеспечение, валидация данных.

Калашникова Ольга Борисовна: визуализация, проведение исследования, написание — подготовка черновика рукописи.

Бабич Ольга Олеговна: концептуализация, научное руководство исследованием.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Рогов, И.А., & Волкова, И.М. (2012). Способ выращивания мяса *in vitro*. Обзор. *Биозащита и биобезопасность*, 4(3), 26–32.
- Rogov, I.A., & Volkova, I.M. (2012). Method of *in vitro* meat cultivation. Review. *Biosecurity and Biosafety*, 4(3), 26–32. (In Russ.).
- Allan, S. J., De Bank, P. A., & Ellis, M. J. (2019). Bioprocess design considerations for cultured meat production with a focus on the expansion bioreactor. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 44. <https://dx.doi.org/10.3389/fsufs.2019.00044>
- Arshad, M.S., Javed, M., Sohaib, M., Saeed, F., Imran, A., & Amjad, Z. (2017). Tissue engineering approaches to develop cultured meat from cells: A mini review. *Cogent Food & Agriculture*, 3, 1320814. <https://dx.doi.org/10.1080/23311932.2017.1320814>
- Awang, A., Arshad, N., Zakaria, F.A., Siti, N., & Uddin, A.M. (2023). A review of cultured meat and its current public perception. *Current Nutrition & Food Science*, 19(9), 928–944. <https://doi.org/10.2174/1573401319666230227115317>
- Balasubramanian, B., Liu, W., Pushparaj, K., & Park, S. (2021). The epic of *in vitro* meat production — A fiction into reality. *Foods*, 10(6), 1395. <https://doi.org/10.3390/foods10061395>
- Basile, A. (2019). Pasquale ferranti, synthetic meat. In *Acceptance, Encyclopedia of Food Security and Sustainability* (pp. 285–288). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22132-X>

- Ben-Arye, T., & Levenberg, S. (2019). Tissue engineering for clean meat production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 46. <https://dx.doi.org/10.3389/fsufs.2019.00046>
- Bhat, Z. F., Morton, J. D., Mason, S. L., Bekhit, A. E. D. A., & Bhat, H. F. (2019). Technological, regulatory, and ethical aspects of *in vitro* meat: A future slaughter-free harvest. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 1192–1208. <https://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12473>
- Bodiou, V., Moutsatsou, P., & Post, M. J. (2020). Microcarriers for upscaling cultured meat production. *Frontiers in Nutrition*, 7, 10. <https://dx.doi.org/10.3389/fnut.2020.00010>
- Bonny, S. P. F., Gardner, G. E., Pethick, D. W., & Hocquette, J. F. (2015). What is artificial meat and what does it mean for the future of the meat industry? *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 255–263. [https://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60888-1](https://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60888-1)
- Bryant, C. & Sanctorem, H. (2021). Alternative proteins, evolving attitudes: Comparing consumer attitudes to plant-based and cultured meat in Belgium in two consecutive years. *Appetite*, 161, 105161. <https://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2021.105161>
- Bryant, C., & Barnett, J. (2018). Consumer acceptance of cultured meat: A systematic review. *Meat Science*, 143, 8–17. <https://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.008>
- Burton, N. M., Krabbenhoft, L., Bryne, K., & Dodson, M. V. (2000). Methods for animal satellite cell culture under a variety of conditions. *Methods in Cell Science*, 22, 51–61.
- Campbell, B. M., Beare, D. J., Bennett, E. M., Hall-Spencer, J. M., Ingram, J. S., Jaramillo, F., & Shindell, D. (2017). Agriculture production as a major driver of the Earth system exceeding planetary boundaries. *Ecology and Society*, 22, 8. <https://dx.doi.org/10.5751/ES-09595-220408>
- Capper, J. L. (2011). The environmental impact of beef production in the United States: 1977 compared with 2007. *Journal of Animal Science*, 89(12), 4249–4261.
- Cederberg, C., Persson, U. M., Neovius, K., Molander, S., & Clift, R. (2011). Including carbon emissions from deforestation in the carbon footprint of Brazilian beef. *Environmental Science & Technology*, 45(5), 1773–1779
- Chriki, S., & Hocquette, J. F. (2020). The myth of cultured meat: A review. *Frontiers in Nutrition*, 7, 7. <https://dx.doi.org/10.3389/fnut.2020.00007>
- Clemente-Suárez, V. J., Beltrán-Velasco, A. I., Redondo-Flórez, L., Martín-Rodríguez, A., & Tornero-Aguilera, J. F. (2023). Global Impacts of Western Diet and Its Effects on Metabolism and Health: A Narrative Review. *Nutrients*, 15(12), 2749. <https://doi.org/10.3390/nu15122749>
- Crosser, N., Bushnell, C., Derbes, E., Friedrich, B., Lamy, J., Manu, N., & Swartz, E. (2020). State of the Industry Report Cultivated Meat. *Good Food Institute*, 3, 24–35.
- Department of Economic and Social Affairs. (2015). United nations department of economic and social affairs, population division. In *World population prospects: The 2015 revision, key findings and advance tables* (pp. 1–66). United Nations.
- Ding, S. Swennen, G. M. Messmer, T., Gagliardi, M., Molin, D. G., Li, C., & Post, M. J. (2018). Maintaining bovine satellite cells stemness through p38 pathway. *Scientific Reports*, 8, 1–12. <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-28746-7>
- Dupont, J., Harms, T., & Fiebelkorn, F. (2022). Acceptance of cultured meat in Germany—Application of an extended theory of planned behaviour. *Foods*, 11(3), 424. <https://doi.org/10.3390/foods11030424>
- Edelman, P. D., McFarland, D. C., Mironov V. A. & Matheny, J. G. (2005). *In Wiro*-cultured meat production. *Tissue Engineering*, 11(5/6), 659–662
- Dupont, J., & Fiebelkorn, F. (2020). Attitudes and acceptance of young people toward the consumption of insects and cultured meat in Germany. *Food Quality and Preference*, 85, 103983. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.103983>
- Eibl, R., Senn, Y., Gubser, G., Jossen, V., van den Bos, C., & Eibl, D. (2021). Cellular agriculture: Opportunities and challenges. *Annual Review of Food Science and Technology*, 12, 51–73.
- Enrione, J., Blaker, J. J., Brown, D. I., Weinstein-Opppenheimer, C. R., Pepczynska, M., Olguín, Y., Sánchez, E., & Acevedo, C. A. (2017). Edible scaffolds based on nonmammalian biopolymers for myoblast growth. *Materials*, 10, 1–15. <https://dx.doi.org/10.3390/ma10121404>
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2023. The State of Food Security and Nutrition in the World 2023. Urbanization, agrifood systems transformation and healthy diets across the rural–urban continuum. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc3017en>
- Fish, K. D., Rubio, N. R., Stout, A. J., Yuen, J. S. K., & Kaplan, D. L. (2020). Prospects and challenges for cell-cultured fat as a novel food ingredient. *Trends in Food Science and Technology*, 98, 53–67. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.005>
- Fraeye, I., Kratka, M., Vandeburgh, H., & Thorrez, L. (2020). Sensorial and nutritional aspects of cultured meat in comparison to traditional meat: Much to be inferred. *Frontiers in Nutrition*, 7, 35. <https://dx.doi.org/10.3389/fnut.2020.00035>
- Gholobova, D., Gérard, M., Decroix, L., Desender, L., Callewaert, N., Annaert, P., & Thorrez, L. (2018). Human tissue-engineered skeletal muscle: A novel 3D *in vitro* model for drug disposition and toxicity after intramuscular injection. *Scientific Reports*, 8, 1–14. <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-30123-3>

- Godfray, H. C. J., Springmann, M., Sexton, A., Lynch, J., Hepburn, C., & Jebb, S. (2019). *Meat: The future series — alternative proteins*. Cologny.
- Handral, K., Tay, S. H., Chan W. W., & Choudhury, D. (2020). 3D Printing of cultured meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(1), 272–281. <https://dx.doi.org/10.1080/10408398.2020.1815172>
- Helliwell, R., & Burton, R. J. F. (2021). The promised land? Exploring the future visions and narrative silences of cellular agriculture in news and industry media. *Journal of Rural Studies*, 84, 180–191. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2021.04.002>.
- Hoang, Y. T. H., & Vu, A. T. L. (2016). Sodium benzoate and potassium sorbate in processed meat products collected in Ho Chi Minh City, Vietnam. *International Journal on Advanced Science Engineering and Information Technology*, 6, 477–482. <https://dx.doi.org/10.18517/ijaseit.6.4.876>
- Hong, T.K., Shin, D.M., Choi, J., Do, J.T., & Han, S.G. (2021). Current Issues and Technical Advances in Cultured Meat Production: A Review. *Food science of animal resources*, 41(3), 355–372. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2021.e14>
- Ismail, I. Hwang, Y. H., & Joo, S. T. (2020). Meat analog as future food: A review. *Journal of Science and Technology*, 62, 111. <https://dx.doi.org/10.5187/jast.2020.62.2.111>
- Kenigsberg, J. A., & Zivotofsky, A. Z. A. (2020). Jewish religious perspective on cellular agriculture. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 128. <https://dx.doi.org/10.3389/fsufs.2019.00128>
- Kikuchi, Y., Kanematsu, Y., Yoshikawa, N., Okubo, T., & Takagaki, M. (2018). Environmental and resource use analysis of plant factories with energy technology options: A case study in Japan. *Journal of Cleaner Production*, 186, 703–717. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.110>
- Lisitsyn, A. B., Chernukha, I. M., & Lunina, O. I. (2019). To the question about meat freezing. Review. *Theory and Practice of Meat Processing*, 4, 27–31. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2019-4-2-27-31>
- Lynch, J., & Pierrehumbert, R. (2019). Climate impacts of cultured meat and beef cattle. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 5. <https://dx.doi.org/10.3389/fsufs.2019.00005>
- Mancini, M. C., & Antonioli, F. (2019). Exploring consumers' attitude towards cultured meat in Italy. *Meat Science*, 150, 101–110. <https://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.12.014>
- Marlow, H.J., Hayes W.K., Soret, S., Carter, R.L., E.R. Schwab, & Sabate, J. (2009). Diet and the environment: does what you eat matter? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 1S-5S
- Morais-da-Silva, L. R., Reis, G. G., Sanctorem, H., Forte, C. & Molento, M. (2022). The social impacts of a transition from conventional to cultivated and plant-based meats: Evidence from Brazil. *Food Policy*, 111, 102337. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodpol.2022.102337>
- National Academies of Sciences. (2017). *Preparing for future products of biotechnology*. The National Academies Press. <https://dx.doi.org/10.17226/24605>
- O'Neill, E. N., Cosenza, Z. A., Baar, K., & Block, D. E. (2021). Considerations for the development of cost-effective cell culture media for cultivated meat production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20, 686–709. <https://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12678>
- Ong, S., Choudhury, D., & Naing, M. W. (2020). Cell-based meat: Current ambiguities with nomenclature. *Trends in Food Science and Technology*, 102, 223–231. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.010>
- Onwezen, M. C., Bouwman, E. P., Reinders, M. J., & Dagevos, H. (2020). A systematic review on consumer acceptance of alternative proteins: Pulses, algae, insects, plant-based meat alternatives, and cultured meat. *Appetite*, 159, 105058. <https://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2020.105058>
- O'Riordan, K., Fotopoulou, A., & Stephens, N. (2017). The first bite: Imaginaries, promotional publics and the laboratory grown burger. *Public Understanding of Science*, 26, 148–163. <https://dx.doi.org/10.1177/0963662516639001>
- Petrov, E. B., Sidorova, V. Y., & Novikov, N. N. (2017). An experimental model of a bioreactor with the control system for *in vitro* meat as a promising source of complete protein. *Journal of VNIIMZH*, 125, 83–87.
- Post, M. J. (2012). Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects. *Meat Science*, 92, 297–301.
- Reiss, J., Robertson, S., & Suzuki, M. (2021). Cell Sources for Cultivated Meat: Applications and Considerations throughout the Production Workflow. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 7513. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms22147513>
- Rodríguez Escobar, M.I., Cadena, E., Nhu, T.T., Cooreman-Algoed, M., De Smet, & S., Dewulf, J. (2021). Analysis of the Cultured Meat Production System in Function of Its Environmental Footprint: Current Status, Gaps and Recommendations. *Foods*, 10(12), 2941. <https://doi.org/10.3390/foods10122941>
- Rogov, I.A., Volkova, I.M., Vostrikova, N.L., & Taranova, K.G. (2013). Cell biomass — the first step in the way of cultured meat. Biotechnology: state of the art and prospects of development: materials of the VII Moscow International Congress, 2, 76
- Rorheim, A., Mannino, A., Baumann, T., & Caviola, L. (2016). Cultured meat: An ethical alternative to industrial animal farming. *Policy paper by Sentience Politics*, 1, 1–14.
- Rubio, N., Datar, I., Stachura, D., Kaplan, D., & Krueger, K. (2019). Cell-based fish: A novel approach to seafood production and an opportunity for cellular agriculture. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 43. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00043>

- Rudenko, R. A., & Tkacheva, I. V. (2022). Modern technologies for the production of artificial meat. *International Scientific Research Journal*, 1(1).
- Santos, A.C.A., Camarena, D.E.M., Roncoli R.G., Chambergo, F.S., Nunes, V.A., Trindade, M.A., & Stuchi Maria-Engler, S. (2023). Tissue engineering challenges for cultivated meat to meet the real demand of a global market. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6033. <https://doi.org/10.3390/ijms24076033>
- Schmidinger, K. (2012). *Worldwide alternatives to animal derived foods. Overview and evaluation models — Solutions to global problems caused by livestock* [Unpublished doctoral dissertation]. Vienna.
- Sexton, A. E., Garnett, T., & Lorimer, J. (2019). Framing the future of food: The contested promises of alternative proteins. *Environment and Planning E: Nature and Space*, 2, 47–72. <https://dx.doi.org/10.1177/2514848619827009>.
- Shaikh, S., Lee, E., Ahmad, K., Ahmad, S.S., Chun, H., Lim, J., Lee, Y., & Choi, I. (2021). Cell types used for cultured meat production and the importance of myokines. *Foods*, 10, 2318. <https://doi.org/10.3390/foods10102318>
- Shepon, A., Eshel, G., Noor, E., & Milo, R. (2018). The opportunity cost of animal-based diets exceeds all food losses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 3804–3809. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.1713820115>
- Slade, P. (2018). If you build it, will they eat it? Consumer preferences for plant-based and cultured meat burgers. *Appetite*, 125, 428–437. <https://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2018.02.030>
- Specht, E. A., Welch, D. R., Clayton, E. M. R., & Lagally, C.D. (2018). Opportunities for applying biomedical production and manufacturing methods to the development of the clean meat. *Biochemical Engineering Journal*, 132, 161–168. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2018.01.015>
- Stephens, N., Di Silvio, L., Dunsford, I., Ellis, M., Glencross, A., & Sexton, A. (2018). Bringing cultured meat to market: Technical, sociopolitical, and regulatory challenges in cellular agriculture. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 155–166. <https://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.010>
- Stephens, N., Sexton, A. E., & Driessen, C. (2019). Making sense of making meat: Key moments in the first 20 Years of tissue engineering muscle to make food. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00045>
- Szejda, K. (2018). *Cellular agriculture nomenclature: Optimizing consumer acceptance*. The Good Food Institute.
- Thorrez, L., & Vandenburg, H. (2019). Challenges in the quest for «clean meat». *Nature Biotechnology*, 37, 215–216. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0043-0>
- Tomiyama, A. J., Kawecki, N. S., Rosenfeld, D. L., Jay, J. A., Rajagopal, D., & Rowat, A. C. (2020). Bridging the gap between the science of cultured meat and public perceptions. *Trends in Food Science & Technology*, 104, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.019>
- Treich, N. (2021). Cultured Meat: Promises and Challenges. *Environmental & Resource Economics*, 79(1), 33–61. <https://doi.org/10.1007/s10640-021-00551-3>
- Tuomisto, H. L. (2019). Vertical farming and cultured meat: Immature technologies for urgent problems. *One Earth*, 1, 275–277. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.024>
- Warner, R. D. (2019). Analysis of the process and drivers for cellular meat production. *Animal*, 13, 3041–3058. <https://dx.doi.org/10.1017/S1751731119001897>
- Waschulin, V., & Specht, L. (2018). *Cellular agriculture: An extension of common production methods of food*. The Good Food Institute.
- Weinrich, R., Strack, M., & Neugebauer, F. (2020). Consumer acceptance of cultured meat in Germany. *Meat Science*, 162, 107924. <https://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107924>.
- Wilks, M., Phillips, C. J., Fielding, K., & Hornsey, M. J. (2019). Testing potential psychological predictors of attitudes towards cultured meat. *Appetite*, 136, 137–145. <https://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2019.01.027>.
- Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., & Murray, C. J. (2019). Food in the Anthropocene: The EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *Lancet*, 393, 447–492. [https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31788-4](https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31788-4).
- Witt, R., Weigand, A., Boos, A. M., Cai, A., Dippold, D., Boccaccini, A. R., & Beier, J. P. (2017). Mesenchymal stem cells and myoblast differentiation under HGF and IGF-1 stimulation for 3D skeletal muscle tissue engineering. *BMC cell biology*, 18, 1–16. <https://dx.doi.org/10.1186/s12860-017-0131-2>.
- Zhang, G., Zhao, X., Li, X., Du, G., Zhou, J., & Chen, J. (2020). Challenges and possibilities for bio-manufacturing cultured meat. *Trends in Food Science and Technology*, 97, 443–450.