

ISSN 2227-2925 (print)
ISSN 2500-1558 (online)

12+

Том 10 N 4

2020



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ

**Прикладная химия
и биотехнология**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия
и биотехнология

Том 10 N 4 2020



ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского
технического университета



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия и биотехнология
Том 10 N 4 2020

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор:

Евстафьев С.Н. д.х.н., профессор, заведующий кафедрой химии и пищевой технологии Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

Заместитель главного редактора:

Пожидаев Ю.В. д.х.н., профессор кафедры химии и пищевой технологии Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

Члены редакционной коллегии:

Боровский Г.Б. д.б.н., профессор, заместитель директора Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск, Россия)

Братская С.Ю. д.х.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией сорбционных процессов Института химии ДВО РАН (г. Владивосток, Россия)

Варфоломеев С.Д. д.х.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (г. Москва, Россия)

Верпоорт Фрэнсис доктор наук, профессор кафедры экологических технологий, пищевых технологий и молекулярной биотехнологии, Гентский Университет Глобал Кампус (филиал в Корее), (г. Инчхон, Корея)

Воронов В.К. д.х.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры информатики Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

Го Эн-зюнь профессор, заведующий лабораторией координационной химии Шеньянского института химической технологии (г. Шеньян, Китай)

Дадашев М.Н. д.т.н., профессор, главный научный сотрудник кафедры физической и коллоидной химии Российского государственного университета нефти и газа им. И.М. Губкина (г. Москва, Россия)

Иоелович М.Я. д.х.н., профессор, руководитель химического отдела биотехнологической компании "Celdesigner" (г. Реховот, Израиль)

Метнер Франк-Юрген доктор наук, профессор, заведующий кафедрой пивоварения Берлинского технического университета (г. Берлин, Германия)

Непомнящих А.И. д.ф.-м.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, заместитель директора Института геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН (г. Иркутск, Россия)

Пуревсурен Б. доктор наук, академик АН Монголии, заведующий лабораторией химии угля Института химии и химической технологии АН Монголии (г. Улан-Батор, Монголия)

Рогожин В.В. д.б.н., профессор, заведующий лабораторией исследования биологически активных веществ Якутской государственной сельскохозяйственной академии (г. Якутск, Россия)

Саловарова В.П. д.б.н., профессор, заведующая кафедрой физико-химической биологии Иркутского государственного университета (г. Иркутск, Россия)

Санжиб Кумар Панда доктор наук, профессор, профессор кафедры наук о жизни и биоинформатики Университета Ассам, (г. Силчар, Индия)

Ульянов Б.А. д.т.н., профессор кафедры химической технологии топлива Ангарского государственного технического университета (г. Ангарск, Россия)

Хуторянский В.В. к.х.н., профессор фармацевтической школы Университета Рединга (г. Лондон, Великобритания)

Цыренов В.Ж. д.б.н., профессор, Заслуженный деятель науки и техники РФ, заведующий кафедрой биотехнологии Восточно-Сибирского государственного университета технологии и управления (г. Улан-Удэ, Россия)

Чхенкели В.А. д.б.н., профессор, заведующая кафедрой анатомии, физиологии и микробиологии Иркутского государственного аграрного университета (г. Иркутск, Россия)

Шен Янминг профессор, заместитель декана факультета химической инженерии, Шеньянский институт химической технологии, (г. Шеньян, Китай)

Ответственный секретарь:

Чеснокова А.Н. к.х.н., Иркутский национальный исследовательский технический университет (г. Иркутск, Россия)

Журнал основан в 2011 г.

Периодичность издания – 4 раза в год.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

Свидетельство ПИ №ФС77-62814 от 18 августа 2015 г.

Учредитель Иркутский национальный исследовательский технический университет

Подписной индекс в Каталоге российской прессы «Почта России» – 24682

Адрес учредителя и издателя:

664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83

Адрес редакции:

664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83, ауд. Д-215

E-mail: biochem@istu.edu

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
IZVESTIYA VUZOV.
Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya
Volume 10 N 4 2020
EDITORIAL BOARD

Editor in Chief :

Sergei N. Evstafev

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Irkutsk National Research Technical University, Head of Chemistry and Food Technology Department (Irkutsk, Russia)

Deputy Editor:

Yuriy N. Pozhidaev

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Irkutsk National Research Technical University, Professor of Chemistry and Food Technology Department (Irkutsk, Russia)

Editorial council:

Gennadiy B. Borovskii

Dr. Sci. (Biology), Professor, Deputy Head of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, (Irkutsk, Russia)

Svetlana Yu. Bratskaya

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Correspondent member of RAS, Institute of Chemistry FEB RAS, Head of the Laboratory of Sorption Processes, (Vladivostok, Russia)

Sergey D. Varfolomeyev

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Correspondent member of RAS, Director of N.M. Emmanuel Institute of Biochemical Physics (Moscow, Russia)

Francis Verpoort

Dr., Professor, Department of Environmental Technology, Food Technology and Molecular Biotechnology, Ghent University Global Campus, (Incheon, Korea)

Vladimir K. Voronov

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Irkutsk National Research Technical University, Professor of Mathematics Department (Irkutsk, Russia)

Enjun Gao

Professor, Head of the Laboratory of Coordination Chemistry, Shenyang Institute of Chemical Technology (Shenyang, China)

Mirali N. Dadashev

Dr. Sci. (Engineering), Professor, Gubkin Russian State University of Oil and Gas, Senior research associate of Physical and Colloid Chemistry Department (Moscow, Russia)

Mikhail Ya. Ioelovich

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Head of Chemical Department, Biotechnology Company "Celdesigner" (Rehovot, Israel)

Frank-Juergen Methner

Dr., Professor, Berlin Institute of Technology, Head of Brewing Science Department (Berlin, Germany)

Alexander I.

Nepomnyashchikh

Dr. Sci. (Phys.-Math.), Professor, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Deputy Director of Vinogradov Institute of Geochemistry SB RAS (Irkutsk, Russia)

Purevsuren Barnasan

Dr. Sci. (Chemistry), Academician of Mongolian AS, Institute of Chemistry and Chemical Technology of Mongolian AS, Head of the Laboratory of Coal Chemistry (Ulan Bator, Mongolia)

Vasily V. Rogozhin

Dr. Sci. (Biology), Professor, Yakutsk State Agricultural Academy, Head of the Laboratory for bioactive substance studies (Yakutsk, Russia)

Valentina P. Salovarova

Dr. Sci. (Biology), Professor, Irkutsk State University, Head of Physical and Chemical Biology Department (Irkutsk, Russia)

Sanjib Kumar Panda

Dr., Professor, Assam University, Department of Life Science & Bioinformatics (Silchar, India)

Boris A. Ulyanov

Dr. Sci. (Engineering), Professor, Angarsk State Technical University, Head of Chemical Technology of Fuels Department (Angarsk, Russia)

Vitaliy V. Khutoryanskiy

Ph.D. (Chemistry), Professor of Pharmaceutical School of University of Reading (London, Great Britain)

Vladimir Zh. Tsyrenov

Dr. Sci. (Biology), Professor, Honored Worker of Science and Engineering of the Russian Federation, East Siberia State University of Technology and Management, Head of Biotechnology Department (Ulan-Ude, Russia)

Vera A. Chkhenkeli

Dr. Sci. (Biology), Professor, Irkutsk State Agricultural University, Head of Anatomy, Physiology and Microbiology Department (Irkutsk, Russia)

Yanming Shen

Professor, Vice-Dean of Department of Chemical Engineering, Shenyang Institute of Chemical Technology (Shenyang, China)

Executive Secretary:

Alexandra N. Chesnokova

Cand. Sci. (Chemistry), Irkutsk National Research Technical University (Irkutsk, Russia)

The journal was founded in 2011. The journal is issued 4 times a year.

The journal is registered with the Federal Agency for Supervision of Communications, Information Technologies and Mass Media.

Certificate of registration FS 77-62814 of 18 August, 2015

The journal is included in Ulrich's Periodicals Directory Founder and Publisher:

the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education

Irkutsk National Research Technical University

The subscription index in the Catalogue of the Russian Press "Pochta Rossii" is – 24682.

Address of the founder and publisher:

83, Lermontov St., Irkutsk, 664074, Russian Federation

Editorial address:

D-215, 83, Lermontov St., Irkutsk, 664074, Russian Federation,

E-mail: biochem@istu.edu

СОДЕРЖАНИЕ

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Воронов В.К., Дударева О.В., Фунтикова Е.А. Исследования комплексов $ZnCl_2$ и $CdCl_2$ с триэтаноламином методами спектроскопии ЯМР и квантовой химии.....	548
Пырко А.Н. Синтез и использование 10-гидрокси-3,3,6,6-тетраметил-9-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-декагидроакридин-1,8-диона в качестве индикатора кислотно-основного титрования.....	556
Асламова В.С., Шалунц Л.В., Асламов А.А., Грабельных В.А. Компьютерное моделирование закономерностей сорбции ионов тяжелых металлов серосодержащим модифицированным цеолитом.....	564
Плотникова А.С., Недвецкая Г.Б., Айзина Ю.А., Серых В.Ю. Кислотно-основные свойства производных имидазо[2,1- <i>b</i>]тиазолов и тиазоло[3,2- <i>a</i>]бензимидазолов.....	573

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Черепанов И.С. Термодеструкция продукта конденсации <i>d</i> -маннозы с <i>l</i> -аминоацетанилидом в системах без растворителя.....	581
Сибирцев В.С., Нечипоренко У.Ю., Кабанов В.Л., Буханцев О.В. Методика электрохимического биотестирования в применении к сравнительному анализу антибиотических свойств растительных экстрактов, получаемых с помощью сжиженного CO_2	590
Харченко У.В., Арефьева О.Д., Панасенко А.Е., Земнухова Л.А., Беленева И.А. Сорбционные свойства кремнийсодержащих образцов по отношению к бактериям.....	603
Еремеева Н.Б., Макарова Н.В., Игнатова Д.Ф., Бахарев В.В. Исследование потенциальных антиканцерогенных и антиоксидантных эффектов экстрактов из растительного сырья.....	613
Бельков В.И., Гарник Е.Ю., Тарасенко В.И., Константинов Ю.М. Система сахаропосредованной регуляции и роль киназ HXK1, SnRK1, TOR у <i>Arabidopsis thaliana</i>	627
Гарипова М.И., Федяев В.В., Фархутдинов Р.Г., Сотникова Ю.М. Выявление соединения, антигенподобного триодтиронину, в клетках высших растений.....	639
Крыжко А.В., Буджурова У.М. Особенности влияния штамма <i>Bacillus thuringiensis</i> 0271 на отдельные показатели неспецифической резистентности <i>Origanum vulgare</i> L. к стрессовым условиям.....	647
Бережная Е.В., Корсукова А.В., Федотова О.А., Дорофеев Н.В., Грабельных О.И. Особенности ростигибирующего эффекта фунгицида азоксистробина и его способность тормозить расход сахаров в проростках озимой пшеницы.....	657
Дриль А.А., Сапожников А.Н. Изучение изменений физико-химических и микробиологических показателей полуфабриката из картофеля после электронной стерилизации.....	666
Нечипоренко А.П., Миневич И.Э., Орехова С.М., Ситникова В.Е., Громова Д.А., Успенская М.В. Инфракрасная Фурье-спектроскопия в сравнительном исследовании животных и растительных белков.....	678
Саласина Я.Ю., Калинкин Д.А., Дейнека В.И., Дейнека Л.А. Некоторые закономерности экстракции антоцианов из растительных источников.....	691
Готлиб Е.М., Вдовина Т.В., Ямалеева Е.С. Повышение биоразлагаемости эпоксидных материалов за счет модификации растительными маслами и их кислородсодержащими производными.....	700
Ха Т.З., Канарский А.В., Канарская З.А., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н. Биосинтез экзополисахаридов почвенными бактериями <i>Raenibacillus mucilaginosus</i> на питательной среде с мелассой.....	708
Руденко Е.Ю. Исследование влияния нефти на биологическую активность черноземной почвы.....	719
Семенычева Л.Л., Кулешова Н.В., Митин А.В., Белая Т.А., Мочкина Д.В. Молекулярно-массовые характеристики и сорбционные свойства пектина, выделенного из разных субстратов.....	728

CONTENTS

CHEMICAL SCIENCES

Voronov V.K., Dudareva O.V., Funtikova E.A. Research into complexes of triethanolamine with ZnCl ₂ and CdCl ₂ using NMR Spectroscopy and Quantum Chemistry methods.....	548
Pyrko A.N. Synthesis and using of 10-hydroxy-3,3,6,6-tetramethyl-9-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-1,8-dion as acid base titration indicator.....	556
Aslamova V.S., Shalunc L.V., Aslamov A.A., Grabelnykh V.A. Computer simulation of the sorption of heavy metal ions by a sulphur-containing modified zeolite.....	564
Plotnikova A.S., Nedvetskaya G.B., Aizin Yu.A., Serykh V.Yu. Acid-base properties of imidazo[2,1- <i>b</i>]thiazole and tiazolo[3,2- <i>a</i>]benzimidazole derivatives.....	273

PHYSICAL-CHEMICAL BIOLOGY

Cherepanov I.S. Thermal destruction of <i>d</i> -mannose condensation products using <i>p</i> -aminoacetanilide in solvent-free systems.....	581
Sibirtsev V.S., Nechiporenko U.Yu., Kabanov V.L., Bukhantsev O.V. Use of an electrochemical biotesting technique for comparing the antibiotic properties of plant extracts obtained using liquefied CO ₂	590
Kharchenko U.V., Arefieva O.D., Panasenko A.E., Zemnukhova L.A., Beleneva I.A. Sorption action of silicon-containing samples against bacteria.....	603
Eremeeva N.B., Makarova N.V., Ignatov D.F., Bakharev V.V. Study of potential anticarcinogenic and antioxidant effects of plant extracts.....	613
Belkov V.I., Garnik E.Yu., Tarasenko V.I., Konstantinov Yu.M. Sugar-mediated regulation and the role of HXK1, SnRK1, TOR kinases in <i>Arabidopsis thaliana</i>	627
Garipova M.I., Fedyayev V.V., Farkhutdinov R.G., Sotnikova J.M. Identification of a compound similar to triiodothyronine in the cells of higher plants.....	639
Kryzhko A.V., Budzhurova U.M. Effects of <i>Bacillus thuringiensis</i> 0271 on individual indicators of nonspecific resistance of <i>Origanum vulgare</i> L. to stressful conditions.....	647
Berezhnaya E.V., Korsukova A.V., Fedotova O.A., Dorofeev N.V., Grabelnykh O.I. Growth-inhibiting effect of azoxystrobin and its ability to inhibit sugar consumption in winter wheat sprouts and roots.....	657
Dril A.A., Sapozhnikov A.N. Study of physicochemical changes and microbiological parameters of semi-finished potato products after electron-beam sterilization.....	666
Nechiporenko A.P., Minevich I.E., Orekhova S.M., Sitnikova V.E., Gromova D.A., Uspenskaya M.V. Fourier-transform infrared spectroscopy in a comparative study of animal and plant proteins.....	678
Salasina Y.Yu., Kalinikin D.A., Deineka V.I., Deineka L.A. Some regularities in the process of anthocyanin extraction from vegetable sources.....	691
Gotlib E.N., Vdovina T.V., Yamaleeva E.S. Increasing the biodegradability of epoxy materials by means of vegetable oils and their oxygenated derivatives.....	700
Ha T.D., Kanarsky A.V., Kanarskaya Z.A., Scherbakov A.V., Shcherbakova E.N. Biosynthesis of exopolysaccharides by soil bacteria <i>Paenibacillus mucilaginosus</i> on a nutrient molasses medium.....	708
Rudenko E.Yu. Effects of crude oil on the biological activity of chernozem soils.....	719
Semenycheva L.L., Kuleshova N.V., Mitin A.V., Belaya T.A., Mochkina D.V. Molecular weight characteristics and sorption properties of pectin extracted from different substrates.....	728

Оригинальная статья / Original article

УДК 544.183.25:543.429.23

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-548-555>



Исследования комплексов $ZnCl_2$ и $CdCl_2$ с триэтаноломином методами спектроскопии ЯМР и квантовой химии

© В.К. Воронов, О.В. Дударева, Е.А. Фунтикова

Иркутский национальный исследовательский технический университет,
г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: Исследованы комплексы $ZnCl_2$ и $CdCl_2$ с триэтаноломином методами квантовой химии и спектроскопии ЯМР. Склонные к лигандному обмену комплексы триэтанолamina могут вступать в клетку в качестве транспорта металлов. Поэтому изучение данного свойства актуально для понимания механизмов биологического действия подобных объектов. Спектры ЯМР 1H и ^{13}C записаны на импульсном спектрометре Bruker DPX250 при 298 К. Неэмпирические квантово-химические расчеты исследованных соединений производились в рамках метода B3LYP с применением программного пакета Gaussian 09. В основу проведенных исследований были положены изменения химических сдвигов и констант спин-спинового взаимодействия при комплексообразовании тяжелых металлов с триэтаноломином. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что изменения химических сдвигов в спектрах ЯМР сопровождаются возрастанием значений констант спин-спиновой связи, причем наиболее значимыми являются прямые константы $^1J(C,H)$ метиленовой группы, связанной с атомом азота. Наблюдаемые особенности спектров ЯМР обусловлены строением и внутримолекулярной динамикой комплексов, что отражает предлагаемая авторами данной работы схема. Для полного понимания наблюдаемых трансформаций в спектрах ЯМР триэтанолamina вследствие влияния процесса комплексообразования были проведены квантово-химические расчеты предполагаемых состояний комплексов и их спектральных характеристик. При расчете комплексов принимались во внимание три состояния, соответствующие моно-, би- и трициклической структурам. Полученный в процессе выполнения данной работы теоретический и экспериментальный материал позволяет сделать вывод о том, что для исследованных комплексов характерны внутримолекулярные обменные процессы, приводящие к усреднению сигналов ЯМР от нескольких существующих в растворе форм. Для $CdCl_2$ с триэтаноломином равновероятны би- и трициклические формы существования комплекса. В случае комплекса $ZnCl_2$ с триэтаноломином более выгодной является трициклическая форма.

Ключевые слова: комплексы $ZnCl_2$ и $CdCl_2$ с триэтаноломином, ЯМР-спектроскопия, неэмпирические расчеты, внутримолекулярные обменные процессы

Благодарности: Авторы работы выражают благодарность доценту Иркутского национального исследовательского технического университета И.А. Ушакову за помощь в выполнении проведенного исследования.

Для цитирования: Воронов В.К., Дударева О.В., Фунтикова Е.А. Исследования комплексов $ZnCl_2$ и $CdCl_2$ с триэтаноломином методами спектроскопии ЯМР и квантовой химии. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 4. С. 548–555. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-548-555>

Research into complexes of triethanolamine with $ZnCl_2$ and $CdCl_2$ using NMR Spectroscopy and Quantum Chemistry methods

Vladimir K. Voronov, Oksana V. Dudareva, Evgeniya A. Funtikova

Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: Complexes of triethanolamine with $ZnCl_2$ and $CdCl_2$ were studied using the methods of quantum chemistry and NMR spectroscopy. Triethanolamine complexes are prone to ligand exchange, which make them suitable as metal transporters. Therefore, research into the biological action of such compounds is of particular importance. 1H and ^{13}C NMR spectra were recorded using a Bruker DPX250 pulsed spectrometer operated at 298 K. Non-empirical quantum-chemical calculations were performed by the B3LYP method

using the Gaussian 09 software package. Changes in the chemical shifts and spin-spin coupling constants during the formation of triethanolamine complexes with heavy metals were studied. The obtained experimental data indicate that changes in the NMR spectrum shifts are accompanied by an increase in the spin-spin coupling constants, with the $^1J(\text{C}, \text{H})$ constants of the methylene group associated with nitrogen being the most significant. On the basis of the conducted NMR spectrum analysis, the authors propose a scheme for describing the structure and intermolecular dynamics of the complexes under study. In order to elucidate the observed changes in the NMR spectra of triethanolamine in the process of complex formation, a series of quantum-chemical calculations was carried out. Three states corresponding to mono-, bi- and tricyclic structures were taken into account. According to the obtained theoretical and experimental results, the complexes under study are characterized by intermolecular metabolic processes that lead to the averaging of NMR signals from various compounds existing in the solution. For triethanolamine complexes with CdCl_2 , the existence of bi- and tricyclic forms is equally probable. For triethanolamine complexes with ZnCl_2 , the tricyclic form seems to be more beneficial.

Keywords: ZnCl_2 and CdCl_2 complexes with triethanolamine, NMR spectroscopy, non-empirical calculations, intermolecular metabolic processes

Acknowledgments: The authors of the work express gratitude to I.A. Ushakov, an Assistant Professor at the Irkutsk National Research Technical University, for his assistance.

For citation: Voronov VK, Dudareva OV, Funtikova EA. Research into complexes of triethanolamine with ZnCl_2 and CdCl_2 using NMR Spectroscopy and Quantum Chemistry methods. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4): 548–555. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-548-555>

ВВЕДЕНИЕ

Триэтаноламин (ТЭА) образует комплексные соединения со многими металлами. Основной особенностью таких комплексов является формирование атрановой структуры, в образовании которой участвуют атом азота и три атома кислорода [1–4]. Синтезированные в последнее десятилетие комплексы ТЭА с хлоридами и ацетатами ряда металлов (Cd , Mg , Zn , Fe , Rh) показали хорошую биологическую активность [5–7]. Склонные к лигандному обмену комплексы ТЭА могут выступать в качестве транспорта эссенциальных (жизненно необходимых) металлов в клетку. Изучение этого предположения составляет исключительную актуальность для понимания механизмов биологического действия подобных объектов.

Исследования комплексных соединений методами спектроскопии ЯМР широко применяются в современной химии [8–16]. При помощи этого вида спектроскопии подтверждают структуры синтезированных соединений, прослеживают механизмы каталитических реакций, изучают динамические характеристики комплексов в растворах. Участие молекулы лиганда в комплексеобразовании приводит к заметным изменениям ее спектральных характеристик. Это относится к изменению химических сдвигов и констант спин-спинового взаимодействия в спектрах ЯМР. Наблюдаемые трансформации в спектрах, вызванные процессом комплексобразования, не всегда легко интерпретируются. Возросшие возможности современных методов квантовой химии и увеличивающиеся расчетные мощности вычислительных машин позволяют исследова-

телям моделировать процессы образования комплексов, изучать механизмы лигандного обмена, производить расчет теоретических значений спектральных параметров. Многие, в том числе достаточно сложные, вычислительные схемы реализованы в многофункциональных программных пакетах (например таких, как программа GAUSSIAN), обеспечивающих высокую эффективность¹ [17–19].

Цель данной работы заключалась в исследовании комплексов ZnCl_2 ТЭА и CdCl_2 ТЭА совместно методами квантовой химии и спектроскопии ЯМР. Ранее квантово-химические расчеты спектров ЯМР обсуждаемых в данной работе комплексов не проводилось.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C записаны на импульсном спектрометре Bruker DPX250 при 298К в 5 мм ампулах с использованием широкополосного датчика ВВО5mmZ3074/58. В качестве растворителя использовали D_2O и CD_3OD . Значения химических сдвигов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C пересчитаны относительно тетраметилсилана (ТМС). Концентрации растворов для записи спектров ЯМР ^1H составляли 5%, спектров ЯМР ^{13}C – 10%. 2М спектры ^1H - ^{13}C HSQC – стандартная импульсная последовательность в фазочувствительной форме TPPI с развязывающей составной импульсной последовательностью GARP во время считывания. Рефокусирующая задержка $D_6=3.4$ мс $1/(2J(\text{C},\text{H}))$ оптимизировалась на значение прямой КССВ $^1J(\text{C},\text{H})=145$ Гц. Неэмпирические квантово-химические расчеты ТЭА, а также комплексов ZnCl_2 ТЭА (1) и CdCl_2 ТЭА (2) производили в рам-

¹Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., et al. Gaussian 09. Wallingford: Gaussian Inc., 2009. 394 p.

ках метода V3LYP. Были выбраны базисные наборы 6-311G(d,p) и qzvр¹ [17]. Для комплексов Cd (2) использовать базисный набор 6-311G(d,p) невозможно по причине его ограниченности. Расчеты проводили в базе qzvр, предназначенной для расчета тяжелых элементов. Расчетные данные получены с применением программного пакета Gaussian 09 [18, 19]. При этом

принимали во внимание существование в растворе нескольких координированных молекулярных структур. Для выполнения этой задачи готовили три разных входных файла, на основании которых проводили оптимизацию геометрических параметров молекул. Эти файлы соответствуют моно-, би- и трициклической вероятным комплексным структурам (рис. 1).

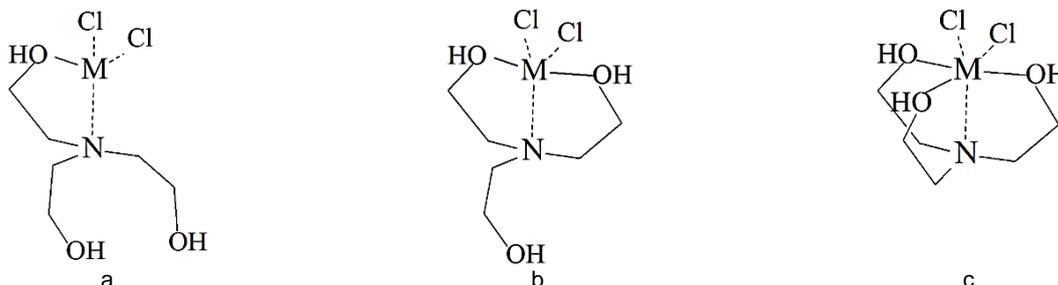


Рис. 1. Структуры комплексов триэтаноламина: моноциклическая (а); бициклическая (b); трициклическая (с)

Fig. 1. Structures of triethanolamine complexes: monocyclic (a); bicyclic (b); tricyclic (c)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Спектры ЯМР. Данные спектров ЯМР ¹H и ¹³C комплексов 1 и 2 приведены в табл. 1. Для сравнения в табл. 1 представлены спектральные характеристики ТЭА, полученные в тех же условиях (D₂O, +25 °С).

Для оценки изменения химического сдвига при комплексообразовании использовали параметр $\Delta = \delta^{13}\text{C}(\text{OCH}_2) - \delta^{13}\text{C}(\text{NCH}_2)$ (разница химических сдвигов сигналов ¹³C от углеродов, связанных с N и O), который оказывается различным для двух исследуемых комплексов по сравнению с исходным ТЭА [8]. Данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют, что изменения химических сдвигов в спектрах ЯМР сопровождаются возрастанием значений констант спин-спинового взаимодействия (КССВ); наиболее значимыми являются прямые константы ¹J(C,H) метиленовой группы, связанной с атомом азота в комплексе 1. Наблюдаемые особенности спектров ЯМР обусловлены строением и внутримолекулярной динамикой комплексов, что отражает схема, приведенная на рис. 2. Ранее было показано, что благодаря схожей динамике подобные комплексы могут участвовать в лигандном обмене [10, 11].

Из приведенной на рис. 2 схемы следует, что при смещении равновесия влево (структура (м)) параметры спектров ЯМР должны приближаться к свободному ТЭА, что и наблюдается для сиг-

налов комплекса 2. В случае реализации структур (б) и (г) данные ЯМР будут существенно отличаться от спектральных характеристик свободного ТЭА.

Анализ квантово-химических расчетов. Для более полного понимания наблюдаемых трансформаций в спектрах ЯМР ТЭА вследствие влияния процесса комплексообразования были проведены квантово-химические расчеты предполагаемых состояний комплексов и их спектральных характеристик. Для комплексов Zn расчеты проводили как в базе 6-311G(d,p), так и базе qzvр. Для комплексов кадмия расчеты данных ЯМР были проведены только в базе qzvр. В процессе расчета комплекса цинка принимались во внимание три состояния, соответствующие моно- (1м), би- (1б) и трициклической (1т) структурам. Оптимизированные геометрии этих структур отражают координацию Zn с атомом азота (длины связей Zn–N, Å: 2,15; 2,16; 2,17 соответственно). Изменения основных геометрических параметров ТЭА отражаются только на увеличении длины связи N–C на 0,03 Å. Наиболее устойчивой, по данным расчета, является атрановая структура (1т). Разница в полной энергии между трициклической и бициклической формами составляет 1,1 ккал/моль, а в сравнении с моноциклической структурой это значение увеличивается до 8 ккал/моль.

Таблица 1. Химические сдвиги, константы спин-спинового взаимодействия триэтаноламина и его комплексов

Table 1. Chemical shifts, spin-spin coupling constants of triethanolamine

Соединение	$\delta, ^1\text{H}$ м.д.		$\delta, ^{13}\text{C}$ м.д. (¹ J(C,H), Гц)		Δ
	NCH ₂	OCH ₂	NCH ₂	OCH ₂	
Триэтаноламин (ТЭА)	2,62	3,55	55,63 (133,1)	58,85 (142,6)	3,22
ZnCl ₂ ТЭА (комплекс 1)	3,16	3,76	55,46 (141,2)	56,11 (144,7)	0,65
CdCl ₂ ТЭА (комплекс 2)	2,78	3,69	55,07 (135,7)	57,21 (144,0)	2,14

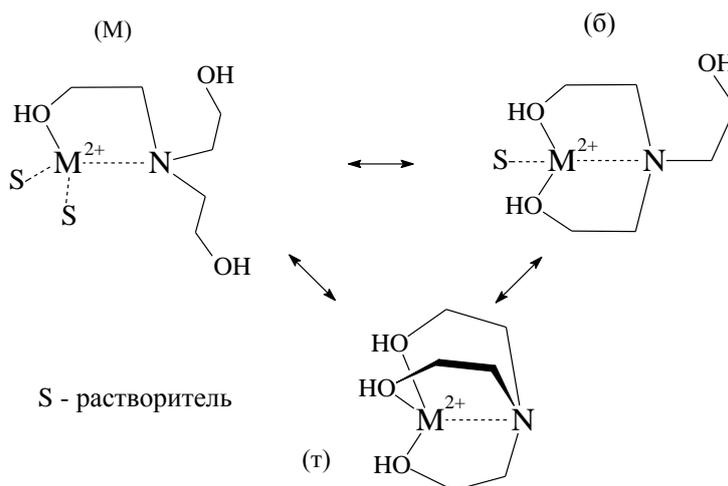


Рис. 2. Возможные формы существования комплексов триэтаноламина в растворе

Fig. 2. Possible forms of existence of triethanolamine complexes in solution

По результатам оптимизации геометрии из трех форм комплекса **2** атрановая форма (**2т**) была определена как самая выгодная – 0 ккал/моль, форма (**2б**) – как наиболее устойчивая – 0,3 ккал/моль. Моноциклическая форма (**2м**) имела $\Delta E = 5,9$ ккал/моль. Низкая разница энергий между (**2б**) и (**2т**) структурами позволила предположить, что и в растворе эти конформации заселены практически одинаково. Значения КССВ и химические сдвиги (ХС) для комплексов усреднялись, что соответствует реальным условиям получения спектров ЯМР, в которых из-за особенностей метода наблюдается усредненная картина. Данные для (**1м**), (**1б**) и (**1т**) форм представлены в табл. 2, где для сравнения приведены теоретические значения для ТЭА.

На основании данных табл. 2 можно заключить, что вовлечение очередной цепи $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$

в координацию, т.е. переход $1\text{м} \rightarrow 1\text{б} \rightarrow 1\text{т}$, приводит к увеличению усредненного значения КССВ ${}^1J(\text{C,H})$ для NCH_2 -группы, что соответствует экспериментальным данным. Для ХС ЯМР ${}^{13}\text{C}$ сигнала OCH_2 -группы наблюдается зависимость по уменьшению его значения при увеличении числа циклов. Эти тенденции влияют на величину параметра Δ . Так, для моноциклической структуры **1м** значение Δ наиболее близко к параметру для свободного ТЭА. Для данных спектров ЯМР ${}^1\text{H}$ обнаруживается эффект уменьшения ХС при увеличении координирующих цепей. Это не согласуется с изменением экспериментальных значений, наблюдаемых в спектрах комплекса. Для комплексов кадмия расчеты данных ЯМР были проведены только в базе qzvp. В табл. 3 суммированы данные по всем соединениям, выполненные в одном приближении.

Таблица 2. Теоретические данные спектров ЯМР ${}^1\text{H}$ и ${}^{13}\text{C}$ для триэтаноламина и его комплексов Zn в B3LYP/6-311G(d,p)

Table 2. Theoretical data of ${}^1\text{H}$ and ${}^{13}\text{C}$ NMR spectra for triethanolamine and its complexes Zn in B3LYP / 6-311G (d, p)

Соединение	Геометрия	$\delta, {}^1\text{H}$ м.д.		$\delta, {}^{13}\text{C}$ м.д.		Δ	${}^1J(\text{C,H}), \text{Гц}$	
		NCH_2	OCH_2	NCH_2	OCH_2		NCH_2	OCH_2
ТЭА	–	3,43	4,55	59,92	67,44	7,52	128,3	136,3
$\text{ZnCl}_2\text{ТЭА}$	1м	3,20	4,14	59,31	64,25	4,95	132,4	136,5
	1б	2,99	3,94	58,24	61,49	3,25	133,3	136,7
	1т	2,68	3,97	59,02	60,03	1,01	134,2	137,1

Таблица 3. Теоретические данные спектров ЯМР ${}^1\text{H}$ и ${}^{13}\text{C}$ для триэтаноламина и комплексов в B3LYP/qzvp

Table 3. Theoretical data of ${}^1\text{H}$ and ${}^{13}\text{C}$ NMR spectra for triethanolamine and complexes in B3LYP/qzvp

Соединение	Геометрия	$\delta, {}^1\text{H}$ м.д.		$\delta, {}^{13}\text{C}$ м.д.		Δ	${}^1J(\text{C,H}), \text{Гц}$	
		NCH_2	OCH_2	NCH_2	OCH_2		NCH_2	OCH_2
ТЭА	–	2,87	4,08	65,68	72,96	7,28	134,1	142,1
$\text{ZnCl}_2\text{ТЭА}$	1м	3,79	4,69	66,63	71,59	4,96	141,3	147,0
	1б	3,60	4,42	65,64	68,84	3,20	140,3	146,0
	1т	3,26	4,46	66,26	67,39	1,13	138,0	147,7
$\text{CdCl}_2\text{ТЭА}$	2м	3,60	4,54	65,48	71,31	5,83	138,6	145,0
	2б	3,40	4,30	64,10	68,10	4,00	137,4	144,3
	2т	3,20	4,29	60,90	64,57	3,67	136,7	144,7

Как показывают данные табл. 3, использование базисного набора qzvp в сочетании с функционалом V3LYP позволяет улучшить воспроизводимость поведения ХС в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C . Действительно, при переходе к комплексным соединениям отмечается существенное смещение сигналов ЯМР ^1H NCH_2 -группы и OCH_2 -группы в слабое поле, что соответствует экспериментальным данным. Следует отметить и предсказуемое поведение параметра Δ , который для комплексов **1** имеет большой диапазон изменения. Интересной особенностью поведения значений КССВ $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$ является уменьшение среднего значения константы для NCH_2 -группы при переходе $1\text{м} \rightarrow 1\text{б} \rightarrow 1\text{т}$, а для константы OCH_2 -группы такая тенденция не обнаруживается. Сравнивая значения КССВ для комплексов цинка и кадмия, необходимо отметить, что они в случае комплексов (**2м**), (**2б**) и (**2т**) систематически меньше примерно на 2 Гц. Этот факт также находится в соответствии с данными, полученными в эксперименте.

Основываясь на данных квантово-химического расчета, можно утверждать, что изменения, наблюдаемые в спектрах ЯМР комплексов **1** и **2**, действительно вызваны процессом комплексообразования. Направления изменения ХС и значений КССВ хорошо воспроизводятся расчетом на уровне V3LYP/qzvp. Учитывая небольшую разность энергий для состояний би- и трициклических форм комплексов, можно с уверенностью утверждать о существовании равновесия этих структур в растворе. В зависимости от природы металла это равновесие смещается, и в случае $\text{ZnCl}_2\text{TЭА}$ оно сдвинуто в сторону трициклической формы, а в случае $\text{CdCl}_2\text{TЭА}$ равнозначно заселены формы (**2б**) и (**2т**).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами спектроскопии ЯМР высокого разрешения и неэмпирическими квантово-химическими расчетами на уровне V3LYP/6-311G(d,p) и V3LYP/qzvp проведено исследование комплексов $\text{ZnCl}_2\text{TЭА}$ и $\text{CdCl}_2\text{TЭА}$. Полученный в процессе выполнения данной работы теоретический и экспериментальный материал позволяет сделать следующие выводы:

1) для исследованных комплексов ТЭА характерны внутримолекулярные обменные процессы, приводящие к усреднению сигналов ЯМР от нескольких существующих в растворе форм;

2) основными характеристическими спектральными параметрами, ответственными за проявление комплексообразования, являются химические сдвиги сигналов от ядер углерода (^{13}C) и значения прямой константы спин-спинового взаимодействия для NCH_2 -группы, получаемые из спектров ЯМР ^{13}C без развязки от протонов;

3) установлено, что для соединения $\text{CdCl}_2\text{TЭА}$ равновероятны би- и трициклические формы существования комплекса. В случае $\text{ZnCl}_2\text{TЭА}$ более выгодной является трициклическая форма. Показано, что совместное использование методов квантовой химии и спектроскопии ЯМР позволяет эффективно исследовать внутримолекулярные превращения комплексов на основе триэтаноламина.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Pinkert A., Ang K.L., Marsh K.N., Pang S. Density, viscosity and electrical conductivity of protic alkanolammonium ionic liquids // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011. Vol. 13. Issue 11. P. 5136–5143. <https://doi.org/10.1039/c0cp02222e>
2. Мирскова А.Н., Мирсков Р.Г., Адамович С.Н., Воронков М.Г. 2-Гидроксиэтиламмониевые соли органилсульфанил(сульфонил)уксусных кислот – новые фармакологически активные соединения // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2011. Т. 19. № 5. С. 467–478.
3. Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных. СПб.: Наука, 2008. 248 с.
4. Naiini A.A., Young V., Verkade J.G. New complexes of triethanolamine (Tea): Novel structural features of $[\text{Y}(\text{TEA})_2](\text{ClO}_4)_3 \cdot 3\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ and $[\text{Cd}(\text{TEA})_2](\text{NO}_3)_2$ // *Polyhedron*. 1995. Vol. 14. Issue 3. P. 393–400. [https://doi.org/10.1016/0277-5387\(95\)93020-2](https://doi.org/10.1016/0277-5387(95)93020-2)
5. Расулов М.М., Воронков М.Г., Нурбеков М.К., Зверева М.В., Мирскова А.Н., Адамович С.Н., Мирсков Р.Г. Комплекс бис-2-(метилфеноксисацетат) цинка с трис-2-(гидроксиэтил)амином – активатор синтеза суммарной триптофанил-тРНК-синтетазы // *Доклады Академии наук*. 2012. Т. 444. № 2. С. 219–220.
6. Колесникова О.П., Мирскова А.Н., Адамович С.Н., Кузнецова Г.А., Кудяева О.Т., Гольдина И.А. [и др.]. Скрининг иммуноактивных свойств триэтаноламина с солями биоэлементов // *Бюллетень СО РАМН*. 2009. № 6 (140). С. 73–79.
7. Патент N 2623034, Российская Федерация. Противоопухолевое средство / С.Н., Адамович, А.Н. Мирскова, О.П. Колесникова; патентообладатель Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН; заявл. 28.07.20164 опублик. 21.06.2017.
8. Ushakov I.A., Voronov V.K., Grishmanovskii D.S., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Mirskova A.N. NMR spectra of metallated alkanolammonium ionic liquids // *Russian Chemical Bulletin*. 2015. Vol. 64. Issue 1. P. 58–61. <https://doi.org/10.1007/s11172-015-0821-x>
9. Панюшкин В.Т., Черныш Ю.Е., Волынкин В.А., Бородкин Г.С., Бородкина И.Г. Ядерный магнитный резонанс в структурных исследованиях. М.: КРАСАНД, 2016. 352 с.
10. Voronov V.K., Ushakov I.A. Structure and intramolecular dynamics of biologically active com-

pounds: analysis of NMR spectra transformed by spin labels // *Applications of NMR Spectroscopy*. 2016. Vol. 5. P. 3–62. <https://doi.org/10.2174/97816810826751160500006>

11. Ushakov I.A., Voronov V.K., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Mirskova A.N.. The NMR study of biologically active metallated alkanol ammonium ionic liquids // *Journal of Molecular Structure*. 2016. Vol. 1103. P. 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.08.074>

12. Naqi H.A., Woodman T.J., Husbands S.M., Blagbrough I.S. ¹⁹F and ¹H quantitative-NMR spectroscopic analysis of fluorinated third-generation synthetic cannabinoids // *Analytical Methods*. 2019. Vol. 11. Issue 24. P. 3090–3100. <https://doi.org/10.1039/c9ay00814d>

13. Chernyak A.V., Slesarenko N.A., Volkov V.I. Complexes based on calix[4]arene sulfonic acid with acetic acid and its derivatives: NMR analysis // *Applied Magnetic Resonance*. 2019. Vol. 50. Issue 1-3. P. 199–209. <https://doi.org/10.1007/s00723-018-1063-5>

14. Воронов В.К. Исследование молекулярного строения по спектрам ЯМР высокого разрешения, трансформированным парамагнитными комплексами // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019. Т. 9. N 2. С. 183–193. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-183-193>

14. Voronov V.K. Use of high-resolution NMR spectra transformed by paramagnetic complexes for studying molecular structure. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(2):183–193. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-183-193>

15. Waudby C.A., Ouvry M., Davis B., Christodoulou J. Two-dimensional NMR lineshape analysis of single, multiple, zero and double quantum cor-

relation experiments // *Journal of Biomolecular NMR*. 2020. Vol. 74. Issue 55. P. 95–109. <https://doi.org/10.1007/s10858-019-00297-7>

15. Waudby CA, Ouvry M, Davis B, Christodoulou J. Two-dimensional NMR lineshape analysis of single, multiple, zero and double quantum correlation experiments. *Journal of Biomolecular NMR*. 2020;74(55):95–109. <https://doi.org/10.1007/s10858-019-00297-7>

16. Selivanov S.I., Wang S., Filatov A.S., Stepanov A.V. NMR study of spatial structure and internal dynamic of adducts of ninhydrin-derived azomethine ylide with cyclopropenes // *Applied Magnetic Resonance*. 2020. Vol. 51. Issue 2. P. 165–182. <https://doi.org/10.1007/s00723-019-01178-w>

17. Krivdin L.B., Sauer S.P.A., Peralta J.E., Contreras R.H. Non-empirical calculation of NMR indirect carbon-carbon coupling constants: 1. Three-membered rings // *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2002. Vol. 40. Issue 3. P. 187–194. <https://doi.org/10.1002/MRC.989>

17. Krivdin LB, Sauer SPA, Peralta JE, Contreras RH. Non-empirical calculation of NMR indirect carbon-carbon coupling constants: 1. Three-membered rings. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2002;40(3):187–194. <https://doi.org/10.1002/MRC.989>

18. Rusakov Yu.Yu., Krivdin L.B. Modern quantum chemical methods for calculating spin-spin coupling constants: theoretical basis and structural applications in chemistry // *Russian Chemical Reviews*. 2013. Vol. 82. Issue 2. P. 99–130. <https://doi.org/10.1070/RC2013v082n02ABEH004350>

19. Krivdin L.B. Carbon-carbon spin-spin coupling constants: Practical applications of theoretical calculations // *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2018. Vol. 105. P. 54–99. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2018.03.001>

REFERENCES

1. Pinkert A, Ang KL, Marsh KN, Pang S. Density, viscosity and electrical conductivity of protic alkanolammonium ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011;13(11):5136–5143. <https://doi.org/10.1039/c0cp02222e>

2. Mirskova AN, Mirskov RG, Adamovich SN, Voronkov MG. 2-Hydroxyethylammonium salts of organylsulphonyl(sulphonyl)acetic acids as new pharmacologically active compounds. *Khimiya v interesakh ustoichivogo razvitiya = Chemistry for Sustainable Development*. 2011;19(5):467–478. (In Russian)

3. Oberlis D, Harland B, Rocky A. *Biological role of macro- and micronutrients in humans and animals*. St. Petersburg: Nauka; 2008. 248 p. (In Russian)

4. Naiini AA, Young V, Verkade JG. New complexes of triethanolamine (Tea): Novel structural features of [Y(TEA)₂](ClO₄)₃·3C₅H₅N and [Cd(TEA)₂](NO₃)₂. *Polyhedron*. 1995;14(3):393–400. [https://doi.org/10.1016/0277-5387\(95\)93020-2](https://doi.org/10.1016/0277-5387(95)93020-2)

5. Rasulov MM, Voronkov MG, Nurbekov MK, Mirskova AN, Adamovich SN, Mirskov RG. Complex bis-2-(methylphenoxyacetate) zinc with tris-2-(hydroxyethyl) amine – activator of synthesis of total tryptophanyl-tRNA-synthetase. *Doklady Akademii nauk*. 2012;444(2):219–220. (In Russian)

6. Kolesnikova OP, Mirskova AN, Adamovich SN, Kuznetsova GA, Kudaeva OT, Goldina IA, et al. Screening of immunoactive and antitumor properties of triethanolamine complex with salts of biotrace elements. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossijskoi akademii meditsinskih nauk*. 2009;6:73–79. (In Russian)

7. Adamovich SN, Mirskova AN, Kolestnikov OP. *Antineoplastic agent*. Patent RF, no. 2623034; 2016. (In Russian)

8. Ushakov IA, Voronov VK, Grishmanovskii DS, Adamovich SN, Mirskov RG, Mirskova AN. NMR spectra of metallated alkanolammonium ionic liquids. *Russian Chemical Bulletin*. 2015;64(1):58–61. <https://doi.org/10.1007/s11172-015-0821-x>

9. Panyushkin VT, Chernysh YE, Volynkin VA, Borodkin GS, Borodkina IG. *Nuclear magnetic resonance in structural studies*. Moscow: CRASAND; 2016. 352 p. (In Russian)

10. Voronov VK, Ushakov IA. Structure and intramolecular dynamics of biologically active compounds: analysis of NMR spectra transformed by spin labels. *Applications of NMR Spectroscopy*. 2016;5:3–62. <https://doi.org/10.2174/97816810826751160500006>

11. Ushakov IA, Voronov VK, Adamovich SN, Mirskov RG, Mirskova AN. The NMR study of biologically active metallated alkanol ammonium ionic liquids. *Journal of Molecular Structure*. 2016;1103:125–131. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.08.074>

12. Naqi HA, Woodman TJ, Husbands SM, Blagbrough IS. ¹⁹F and ¹H quantitative-NMR spectroscopic analysis of fluorinated third-generation synthetic cannabinoids. *Analytical Methods*. 2019;11(24):3090–3100. <https://doi.org/10.1039/c9ay00814d>

13. Chernyak AV, Slesarenko NA, Volkov VI. Complexes based on calix[4]arene sulfonic acid with acetic acid and its derivatives: NMR analysis. *Applied Magnetic Resonance*. 2019;50(1-3):199–209. <https://doi.org/10.1007/s00723-018-1063-5>

14. Voronov VK. Use of high-resolution NMR spectra transformed by paramagnetic complexes for studying molecular structure. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(2):183–193. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-183-193>

15. Waudby CA, Ouvry M, Davis B, Christodoulou J. Two-dimensional NMR lineshape analysis of single, multiple, zero and double quantum correlation experiments. *Journal of Biomolecular NMR*. 2020;74(55):95–109. <https://doi.org/10.1007/s10858-019-00297-7>

16. Selivanov SI, Wang S, Filatov AS, Stepanov AV. NMR study of spatial structure and internal dynamic of adducts of ninhydrin-derived azomethine ylide with cyclopropenes. *Applied Magnetic Resonance*. 2020;51(2):165–182. <https://doi.org/10.1007/s00723-019-01178-w>

17. Krivdin LB, Sauer SPA, Peralta JE, Contreras RH. Non-empirical calculation of NMR indirect carbon-carbon coupling constants: 1. Three-membered rings. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2002;40(3):187–194. <https://doi.org/10.1002/MRC.989>

18. Rusakov YuYu, Krivdin LB. Modern quantum chemical methods for calculating spin-spin coupling constants: theoretical basis and structural applications in chemistry. *Russian Chemical Reviews*. 2013;82(2):99–130. <https://doi.org/10.1070/RC2013v082n02ABEH004350>

19. Krivdin LB. Carbon-carbon spin-spin coupling constants: Practical applications of theoretical calculations. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2018;105:54–99. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2018.03.001>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Воронов Владимир Кириллович,
д.х.н., профессор,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ e-mail: vladim.voronov1945@yandex.ru

Дударева Оксана Владимировна,
к.геол.-мин.н., доцент,
руководитель отделением
прикладной математики и информатики,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: odudareva@mail.ru

Фунтикова Евгения Александровна,
к.х.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: kxn@bk.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Vladimir K. Voronov,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ e-mail: vladim.voronov1945@yandex.ru

Oksana V. Dudareva,
Cand. Sci. (Geology & Mineralogy),
Associate Professor,
Department Manager,
Applied Mathematics and Informatics
Department,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: odudareva@mail.ru

Evgeniya A. Funtikova,
Cand. Sci. (Chemistry),
Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: kxn@bk.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Статья поступила в редакцию 11.05.2020; одобрена после рецензирования 20.06.2020; принята к публикации 30.11.2020.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

The article was submitted 11.05.2020; approved after reviewing 20.06.2020; accepted for publication 30.11.2020.



Synthesis and using of 10-hydroxy-3,3,6,6-tetramethyl-9-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-1,8-dion as acid base titration indicator

© Anatoliyi N. Pyrko

International Sakharov Environmental Institute
of Belarusian State University, Minsk, Belarus

Abstract: The aim of this work is the synthesis of new 10-hydroxydecahydroacridine-1,8-dione derivative, determination of the structure and to study the possibility of using this compound as an indicator of acid-base titration. Environmentally friendly synthesis of 10-hydroxy-3,3,6,6-tetramethyl-9-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-1,8-dion has been developed by one pot interaction of dimedone, hydroxylamine and 4-hydroxy-3-methoxybenzoic aldehyde in water-alcohol or water solution using citric acid or sodium dodecyl sulfate as catalysts, respectively. Purification of the synthesized compound was carried out by crystallization from ethanol. The obtained compound was characterised by ^1H NMR, ^{13}C NMR and UV-Vis spectroscopies. This substance in water-alcohol solution shows intense violet light absorption. Addition alkali induces red shift of absorption maximum to the blue region. UV irradiation of solution of this substance in alcohol induces two-band fluorescence in the visible region. One band disappears upon addition of a base in solution. The structure of the obtained compound was confirmed by high resolution mass-spectrometry analysis. In the mass-spectrum of 10-hydroxy-3,3,6,6-tetramethyl-9-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-1,8-dion observed $[\text{M}+1]^+$ ion peak. The base peak corresponds to tricyclic fragment due to the elimination aromatic cycle from molecular ion. This substance is colorless in acidic and neutral and pink in base solutions. The acid dissociation constant of this compound in a water-alcohol solution was determined by the UV-Vis spectroscopic technique. It was shown that the obtained compound can be used as an indicator for the titration of strong acids and bases.

Keywords: organic synthesis, 10-hydroxydecahydroacridinedione derivative, acid dissociation constant, indicator for the acid-base titration, spectral methods

For citation: Pyrko AN. Synthesis and using of 10-hydroxy-3,3,6,6-tetramethyl-9-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-1,8-dion as acid base titration indicator. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):556–563. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-556-563>

УДК 547.835 + 543.06

Синтез и использование 10-гидрокси-3,3,6,6-тетраметил-9-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-декагидроакридин-1,8-диона в качестве индикатора кислотно-основного титрования

А.Н. Пырко

Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

Резюме: Целью данной работы являлся синтез нового производного 10-гидроксидекагидроакридин-1,8-диона, определение структуры и изучение возможности использования этого соединения в качестве индикатора кислотно-основного титрования. Синтез 10-гидрокси-3,3,6,6-тетраметил-9-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-декагидроакридин-1,8-диона осуществлен с учетом принципов «зеленой химии» взаимодействием димедона, гидроксилamina и 4-гидрокси-3-метоксибензойного альдегида в экологически безопасном водно-спиртовом или водном растворе. В качестве катализатора использовалась лимонная кислота либо додецил сульфат натрия соответственно. Очистку синтезированного соединения осуществляли кристаллизацией из этанола. Полученное соединение характеризовали с помощью спектров ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР, поглощения и флуоресценции в УФ-видимой области. В водно-спиртовом растворе гидроксидекагидроакридиндиона наблюдается поглощение фиолетового света, максимум полосы поглощения которого смещается в область го-

любого света при добавлении к раствору щелочи. При облучении этанольного раствора УФ-излучением возникает двухполосная флуоресценция в видимой области. Одна полоса исчезает при добавлении основания в раствор. Структура полученного соединения подтверждена масс-спектрометрическим анализом высокого разрешения. В масс-спектре 10-гидрокси-3,3,6,6-тетраметил-9-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-декагидроакридин-1,8-диона имеется пик иона $[M+1]^+$. Пик основного иона соответствует трициклическому фрагменту элиминирования ароматического цикла молекулярного иона. Это вещество бесцветно в кислых и нейтральных растворах, а в основных имеет розовый цвет. Кислотную константу диссоциации этого соединения в водно-спиртовом растворе определяли спектрофотометрическим методом в УФ-видимой области. Показано, что полученное соединение может быть использовано в качестве индикатора титрования сильных кислот и оснований.

Ключевые слова: органический синтез, производное 10-гидрокси-3,3,6,6-тетраметил-9-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-декагидроакридиндиона, константа диссоциации кислоты, индикатор кислотно-основного титрования, спектральные методы

Для цитирования: Пырко А.Н. Синтез и использование 10-гидрокси-3,3,6,6-тетраметил-9-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-декагидроакридин-1,8-диона в качестве индикатора кислотно-основного титрования. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 4. С. 556–563. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-556-563>

INTRODUCTION

Heterocyclic compounds that include the 1,4-dihydropyridine fragment in their structure are of great interest to medical chemists [1–3] due to their wide range of biological effects. Compounds of this type have antihypertensive, anticonvulsant, antioxidant antibacterial, antiviral, antiviral, spasmolytic, contraceptive activity, without showing a mutagenic effect [4–6].

Decahydroacridinediones contain a 1,4-dihydropyridine ring as structural fragment and are available via various versions of Hantzsch synthesis [7–11]. These compounds exhibit a broad spectrum of biological activity [12–15]. Decahydroacridines with pesticidal activities have been detected [16]. The dyes of the decahydroacridine series have been intensively studied due to the application of them, in particular, as laser dyes and fluorescent markers [17].

Earlier, we described the method synthesis of 10-hydroxy-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridine-1,8-diones [18]. These substances are colorless in acidic and neutral and pink in base solutions. That is why they can be suitable acid-base titration indicators.

Here in we wish to report our results on synthesis of 10-hydroxy-3,3,6,6-tetramethyl-9-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-1,8-dion **1** and the possibility of using this compound as indicator of acid-base titration.

MATERIALS AND METHODS

In our article [18] the method synthesis of 10-hydroxy-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-1,8-dion derivatives by three-component heterocyclization of dimedone, hydroxylamine with aldehydes in dry pyridine was described. The reaction of cyclization proceeds as a result of heating of equimolar quantities of dimedone and hydroxylamine hydrochloride in a solution of dry pyridine with addition of aromatic aldehyde, but pyridine is a toxic and foul-smelling

substance, therefore, guided by the principles of "green chemistry" [19], we have excluded its use in the synthesis of decahydroacridinedione. The substance investigated was obtained by the interaction of dimedone **2**, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic aldehyde **4** (vanillin), hydroxyl-amine hydrochloride **3** and sodium acetate in an aqua-alcohol (1:1, 1:2 volume units) or in an aqueous solution. In the first procedure, citric acid was used as a catalyst, and in the second, sodium dodecyl sulfate, respectively. 10-Hydroxy-3,3,6,6-tetramethyl-9-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-1,8-dion **1** was obtained with a good yield (83 and 92%, respectively).

This substance is colorless in acidic and neutral and pink in base solutions. That is why it can be suitable acid-base titration indicator. In water-alcohol solution hydroxydecahydroacridinedione **1** shows intense absorption with band maximum at 401.5 nm. Addition alkali induces red shift of absorption maximum to 502.5 nm. It is obvious that observed changes in the electronic absorption spectrum result from formation of anion (II) in alkaline solution (Fig. 2). Both absorption bands are wide and correspond to intramolecular charge transfer between donor and acceptor groups in the molecule. The presence of a negative charge in the donor part of the molecule (NO^-) increases the energy of the highest occupied molecular orbital (HOMO), which is responsible for red shift of charge-transfer band. Electron acceptors are two carbonyl groups.

By measuring the change in the optical density of absorption, proportional to the concentration of the painted form (II) depending on the pH-value of water or water-alcohol solutions of several hydroxydecahydroacridinediones (I), we calculated the values of acid dissociation constant (K_{Ind}) of this compound, which allows you to set the color changing pH range of the indicator. It is determined by the value of the constants: $\Delta\text{pH}_{\text{Ind}} = \text{p}K_{\text{Ind}} \pm 1$.

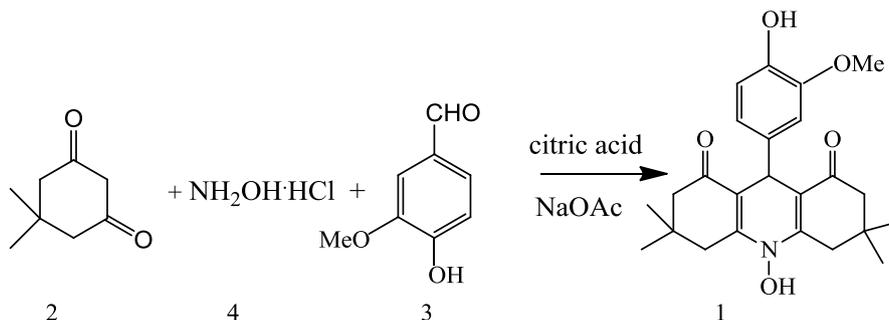


Fig. 1. Scheme of synthesis of 10-hydroxy-3,3,6,6-tetramethyl-9-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-1,8-dion

Рис. 1. Схема синтеза 10-гидрокси-3,3,6,6-тетраметил-9-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-декагидроакридин-1,8-диона

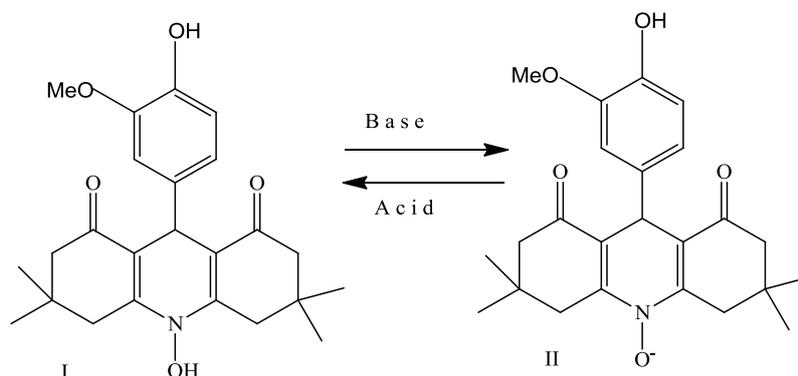


Fig. 2. Scheme of dissociation of 10-hydroxy-3,3,6,6-tetramethyl-9-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-1,8-dion

Рис. 2. Схема диссоциации 10-гидрокси-3,3,6,6-тетраметил-9-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-декагидроакридин-1,8-диона

The reversible dissociation process $I \leftrightarrow II + H^+$ is characterized by dissociation constant:

$$K_{diss.} = \frac{[H^+][II]}{[I]} \quad (1)$$

Where: $[H^+]$, $[I]$ and $[II]$ are molar concentrations of proton, acid and its conjugate base (salt), respectively. To use this formula, it is necessary to determine the concentrations of all three components. Proton concentration was determined with a pH meter, a concentration of the base form - using spectrophotometric measurements. The mathematical expression for calculating the constants obtained as follows.

Denote the total concentration of both forms of C_0 . The concentration of the main (colored) form denoted C , then the concentration of the acid form is $C_0 - C$ expression for the dissociation constant is:

$$K_{diss.} = \frac{[H^+] \cdot C}{C_0 - C} \quad (2)$$

Bouguer – Lambert – Beer law [20] relates the molar concentration of the substance with the optical density of the maximum absorption of the solute (form):

$$D_{max.} = C_M \cdot l \cdot \varepsilon \text{ or } C_M = \frac{D_{max.}}{\varepsilon \cdot l} \quad (3)$$

where $D_{max.}$ – the optical density of the absorption maximum; C_M – its molar concentration; l – cell width, cm; ε – molar extinction.

Using the expression of the optical density concentration, denoting $C_0 \cdot l \cdot \varepsilon = D_0$ in the equation for the equilibrium constants have:

$$K_{diss.} = \frac{[H^+] \cdot D_{max.}}{D_0 - D_{max.}} \text{ or } K_{diss.} \cdot (D_0 - D_{max.}) = [H^+] \cdot D_{max.}$$

If during the measurement the solution volume and the temperature does not change, then a number of successive measurements of pH values and corresponding densities longwave absorption maximum core mold (II) left side of the equation remains constant. Then, for two consecutive measurements (1 and 2) can be written:

$$K_{diss.} \cdot D_0 = K_{diss.} \cdot D_1 + [H^+]_1 \cdot D_1 = K_{diss.} \cdot D_2 + [H^+]_2 \cdot D_2,$$

then

$$K_{diss.} = \frac{[H^+]_2 \cdot D_2 - [H^+]_1 \cdot D_1}{D_1 - D_2} \quad (5)$$

In the resulting expression is absent D_0 , which means there is no need to prepare a certain concentration of solution of the substance (C_0) and using the resulting expression eliminates the need to weigh the samples and measuring the volume of the solution, and thus eliminates the associated measurement errors. Obviously, the accuracy of determining the dissociation constant depends on the range of measurement. At high pH, the concentration of the acid form is insignificant and low-basic. In the first case, the denominator in the expression for the dissociation constant tends to zero in the second – the numerator. Comparable amounts of both forms are solutions in which the pH is close to $pK_{diss.}$ (at $pH = pK$ concentrations of both forms of the same, that is, $C = 0,5C_0$).

EXPERIMENTAL

Dimedone, hydroxylamine hydrochloride, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic aldehyde, sodium acetate and citric acid were acquired from Sigma-Aldrich and used without further purification. The UV-Vis absorption spectra were recorded on a UV-2501 PC spectrophotometer. Fluorescence spectra were measured on RF-5301 PC ("Shimadzu", Japan) spectrofluorometer. The 1H and ^{13}C NMR spectra of compound were examined on a Bruker Avance 500 spectrometer at 500 and 125 MHz, respectively; tetramethylsilane was used as internal reference. Chromatographic-mass spectrometric analysis was carried out on liquid hybrid chromatography mass spectrometer LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Electron Corporation, USA), which includes a linear Quadrupole trap LTQ XL and the orbital trap of high permission. Ionization of the sample was carried out electrospray with using the source H-ESI II Ion Max. Calibration of linear and orbital traps LTQ Orbitrap Discovery was carried out using a standard solution, containing caffeine (m/z 195), L-methionyl-arginyl-phenylalanine acetate (MRFA, m/z 524) and Ultramark 1621 (mixture of fluorinated phosphazines). As an internal calibrant during the removal of mass spectra indapamide was used (m/z 66.0674).

The progress of reaction and the purity of product was monitored by TLC on Silufol UV-254 plates using EtOAc–hexane (1:1) as eluent; spots were visualized under UV radiation or by treatment with iodine vapor, followed by calcination at 250–350 °C. The melting point was determined on a Boetius hot stage.

Procedures for synthesis of 10-hydroxy-3,3,6,6-tetramethyl-9-(4-hydroxy-3-phenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-1,8-dion (1).

1. A mixture of 2.8 g (20 mmol) of 5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione (dimedone), 1.52 g

(10 mmol) of 4-hydroxy-3-methoxybenzoic aldehyde (vanillin) and 0.2 g of citric acid was stirred for one hour at room temperature in 50 ml of ethanol. Then 0.695 g (10 mmol) of hydroxylamine hydrochloride, 0.82 g (10 mmol) sodium acetate and 50 ml water were added thereto and stirred for another two hours. It was then diluted with 50 ml of water, and left to stand for 24 h. The precipitate was filtered off, washed with water (150 ml), and dried in air. Yield 3.41 g (83%), mp 184–186 °C. UV spectrum, EtOH, nm (log ϵ): 257 (4.13); 401.5 (3.77), 1H NMR spectrum (DMSO- d_6), δ , ppm: 0.91 s (6H, 2Me), 0.99 s (6H, 2Me), 2.27 s (4H, 2CH₂), 2.51 s (4H, 2CH₂), 3.60 s (3H, OMe), 5.75 s (1H, 9-H), 6.30–6.60 m (3H_{arom}). ^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6), δ_C , ppm: 28.39 (4Me), 30.49 (C4,C5), 31.13 (C9), 32.01 (C3, C6), 47.07 (OMe), 55.84 (C2, C7), 111.17 (C8a, C9a), 111.36 (C_{arom}), 111.48 (C_{arom}), 115.42 (C_{arom}), 119.12 (C_{arom}), 132.43 (C_{arom}), 144.36 (C_{arom}), 147.92 (C4a, 10a), 189.03 (C1, C8). Found, %: C – 69.92; H – 7.13; N – 3.31. C₂₄H₂₉NO₅. Calculated, %: C – 70.05; H – 7.10; N – 3.40.

2. A mixture of 1.4 g (10 mmol) of dimedone, 0.34 g of hydroxylamine hydrochloride (NH₂OH · HCl), 0.42 g (5 mmol) of sodium acetate (NaOAc) in the presence of 0.2 g of sodium dodecyl sulfate (C₁₂H₂₅OSO₃Na) as a catalyst was stirred in aqueous solution (20 ml H₂O) for 45 min. Then 0.76 g (5 mmol) of 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin) was added and stirred for 6 h at room temperature. For a deeper precipitation, potassium sulfate (K₂SO₄) was added to the aqueous solution. The precipitated green crystals were washed with 50 ml of water and dried in air. Crystallized from ethanol. The yield was 1.90 g (92%).

Procedure for determining the dissociation constant. The total solution volume was 100 ml, wherein 50 ml buffer and 50 ml of ethanol. Buffer was Triss – 1.21 g per 100 ml. Needless active substance is 5 mg. A pH meter for measuring the pH of the solution was adjusted to 6.86 by adding hydrochloric acid. Then poured into a cuvette 2 ml of the solution and the absorption spectrum was recorded on a spectrophotometer UV-2501 PC. Then, the pH was increased with concentrated KOH to pH 7.24, 7.61, 7.97, 8.41, 8.98, 9.73, 10.34, 10.79, 11.02 respectively, and re-measured with a spectrophotometer. Registration density maximum absorption was carried out at 502.5 nm. The pH measurements were taken at 20 °C using an HI 221 pH meter. The error of the ten definitions of the dissociation constant K for solutions of compound 1a was calculated as the root mean square error of the arithmetic mean (standard deviation) taking into account the Student coefficient of 2.26 for ten determinations for the confidence probability $P = 0.95$.

RESULTS AND DISCUSSION

The structure of the obtained compound is confirmed by the data of the 1H and ^{13}C NMR, UV spectra, elemental and mass spectrometric analysis. The

^1H and ^{13}C NMR spectra correspond to structure with symmetry plane passing through the C^9 and N^{10} atoms [18]. Thus, in the ^1H NMR spectrum of compound four methyl groups in positions 3, 6 and four methylene groups in 2, 4, 5, 7 positions appear as two singlets (0.91;0.99 and 2.27; 2.51 ppm respectively). The ^{13}C NMR spectrum exhibited 15 signals of 24 carbon atoms, because the signals of equivalent atoms coincide.

The structure of compound **1** was confirmed by high resolution mass-spectrometry data (Table 1). In the spectrum observed $[\text{M}+1]^+$ (412 m/z), ion peak. The base peak (288 m/z) corresponds to tricyclic fragment due to cleavages ($\text{C}^9-\text{C}^1_{\text{arom}}$) bond and the elimination aromatic cycle from molecular ion. Such type fragmentation was observed for other 9-aryldecahydroacridine-1,8-dione derivatives [21].

Results of measurements and calculations are given in the table 2. The resulting value pK_{diss} , conversion process $\text{I} \leftrightarrow \text{II}$ is 7.425 ± 0.016 . The value of the dissociation constant indicates the possibility of

using this compound as an indicator for the titration of strong acids and bases. In this case, it is a better indicator than phenolphthalein and methyl orange, since its pK is close to the pH equivalence point (neutral medium pH = 7.0).

Irradiation of solution of this substance in alcohol (λ_{max} , 370 nm) induces fluorescence at λ_{max} , 468 and λ_{max} , 680 nm. First band disappears upon addition of a base in solution. Irradiation of basic solution (λ_{max} , 500 nm) induces fluorescence at λ_{max} , 680 nm (Fig. 3). The presence of two bands in the fluorescence spectrum of hydroacridinedion (I) in a neutral medium can be explained by its dissociation in an excited state and its transformation into an anion (II) (see Fig. 2). The long-wavelength band at 680 nm corresponds to the emission of an excited anionic form II. Since obtained hydroacridindion shows two emission bands in the visible region of fluorescent spectrum with large Stokes shift, it is of interest as fluorescent marker for studying biological molecules and supra-molecular structures.

Table 1. Data of mass-spectrometric measurement for compound **1**

Таблица 1. Данные масс-спектрометрических измерений соединения **1**

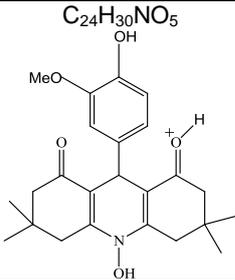
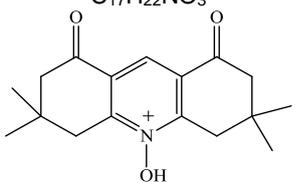
Calculated, m/z	Observed, m/z	Simulated empirical and structural ion formula	Mass measurement error (Δppm)
412.21185	412.21072	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{NO}_5$ 	-2,740
288.15942	288.15822	$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{NO}_3$ 	-4.165

Table 2. The results deteming of acid dissociation constant of decahydroacridine solution

Таблица 2. Результаты определения константы диссоциации раствора декагидроакридиндиона

Number measuring	pH	$[\text{H}^+]/10^{-10}$, mol/l	D	* $\text{K}_{m,n}$	* $\text{K}_{m,n} \cdot 10^{-8}$	* $\text{pK}_{m,n}$	$\text{K}_{\text{average}} \pm \Delta\text{K}$, $\text{pK}_{\text{average}} \pm \Delta\text{pK}$
1	6.86	1380.384	0.153	$\text{K}_{1/2}$	3.791	7.421	$\text{K}_{\text{average}} \pm \Delta\text{K}$
2	7.24	575.440	0.282	$\text{K}_{1/3}$	3.806	7.420	$(3.758 \pm 0.024) \cdot 10^{-8}$
3	7.61	245.471	0.432	$\text{K}_{1/4}$	3.761	7.425	
4	7.97	107.152	0.556	$\text{K}_{1/5}$	3.758	7.425	
5	8.41	38.904	0.648	$\text{K}_{2/3}$	3.753	7.426	$\text{pK}_{\text{average}} \pm \Delta\text{pK}$
6	8.98	10.471	0.696	$\text{K}_{2/4}$	3.748	7.426	7.424 ± 0.016
7	9.73	1.862	0.711	$\text{K}_{2/5}$	3.746	7.426	
8	10.34	0.457	0.714	$\text{K}_{3/4}$	3.742	7.427	$\Delta\text{pH}_{\text{Ind}} = \text{pK}_{\text{Ind}} \pm 1$
9	10.79	0.162	0.715	$\text{K}_{3/5}$	3.741	7.427	
10	11.02	0.095	0.715	$\text{K}_{4/5}$	3.739	7.427	$6.424-8.424$

* $\text{K}_{m,n}$ and * $\text{pK}_{m,n}$ are K_{diss} and pK_{diss} calculated using the formula (5) based on measurement of pH, D numbers m and n.

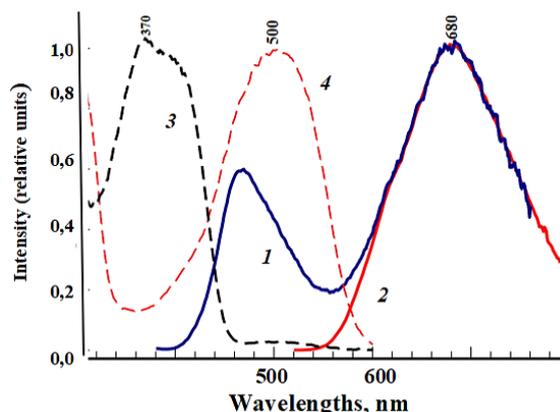


Fig. 3. Fluorescence (1, 2) and excitation of fluorescence (3, 4) spectra of hydroacridindione (I) and anion (II) in ethanol (1, 3) and ethanol-alkali (2,4) solution

Рис. 3. Спектры флуоресценции (1,2) и возбуждения флуоресценции (3, 4) гидроакридиндиона (I) аниона (II) в этаноле (1, 3) и в щелочно-этанольном (2, 4) растворе

CONCLUSIONS

1. In accordance with the principles of green chemistry 10-hydroxy-3,3,6,6-tetramethyl-9-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridin-1,8-dione has been synthesized by two environmentally benign methods using non-toxic reagents, solvents and catalysts.

2. The structure of obtained compound has been confirmed by the data of the ^1H and ^{13}C NMR, UV spectra, elemental and mass spectrometric analysis.

3. The acid dissociation constant of the resulting compound in hydroalcoholic solution was determined by the UV-Vis spectroscopic technique.

4. It has been shown that this compound can be used as an indicator for the titration of strong acids and bases.

5. Fluorescence spectra have been studied and it has been shown that this compound is of great interest as a fluorescent marker.

REFERENCES

- Ozols YaYa, Pyrko AN, Lakhvich FA, Vigante VA, Dubure RR, Dubur GYa, et al. Synthesis of decahydrophenanthridine-1,7-dione and hexahydroisoquinol-8-one derivatives in the reaction of 2-acetyl-2-cyclohexene-1-ones with conjugated enaminocarbonyl compounds. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 1990;26(1):58–62. <https://doi.org/10.1007/BF00506849>
- Ozols YaYa, Pyrko AN, Vigante BA, Dubure RR, Dubur GYa. Synthesis of phenyl-substituted derivatives of decahydro-1,7-phenanthridinedione and hexahydro-8-isoquinolone. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 1992;28(5):530–534. <https://doi.org/10.1007/BF00475250>
- Milkovic L, Vukovic T, Zarkovic N, Tatzber F, Bisenieks E, Kalme Z, et al. Antioxidative 1,4-dihydropyridine derivatives modulate oxidative stress and growth of human osteoblast-like cells *in vitro*. *Antioxidants*. 2018;7(9):1–23. <https://doi.org/10.3390/antiox7090123>
- Mishnev A, Bisenieks E, Mandrika I, Petrovska R, Kalme Z, Bruverea I, et al. Crystal structure and metabolic activity of 4-(thien-2-yl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethoxycarbonylphenyl-methylester. *Acta Crystallographica. Section E*. 2018;E74:1577–1579. <https://doi.org/10.1107/S2056989018014251>
- Shekari F, Sadeghpour H, Javidnia K, Saso L, Nazari F, Firuzi O, et al. Cytotoxic and multidrug resistance reversal activities of novel 1,4-dihydropyridines against human cancer cells. *European Journal of Pharmacology*. 2015;746:233–244. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.058>
- Velena A, Zarkovic N, Troselj KG, Bisenieks E, Krauze A, Poikans J, et al. 1,4-Dihydropyridine derivatives: dihydronicotinamide analogues – model compounds targeting oxidative stress. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*. 2016;216. Article ID 1892412. <https://doi.org/10.1155/2016/1892412>
- Marjani AP, Khalafy J, Chitan M, Mahmoodi S. Microwave-assisted synthesis of acridine-1,8(2H,5H)-diones via a one-pot, three component reaction. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2017;36(2):1–6.
- Nalini V, Girija R. Synthesis, characterization and biological studies of 9-aryl substituted acridinedione derivatives by Hantzsch condensation. *International Journal of Current Research*. 2013;5(10):3076–3081.
- Safaei-Ghomi J, Ghasemzadeh MA, Zahedi S. ZnO nanoparticles: a highly effective and readily recyclable catalyst for the one-pot synthesis of 1,8-dioxo-decahydroacridine and dioxooctahydroxanthene derivatives. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 2013;57(1):1–7.
- Xia J-J, Zhang K-H. Synthesis of N-substituted acridinediones and polyhydroquinoline derivatives in refluxing water. *Molecules*. 2012;17(5):5339–5345. <https://doi.org/10.3390/molecules17055339>
- Kalalawe VG, Munde RD, Kagne RP, Niwadange SN, Gutte RD. Synthesis of acridine derivatives using ionic liquid as promoter. *International Journal of Green and Herbal Chemistry. Section B*. 2018;7(2):188–193. <https://doi.org/10.24214/IJGHC/GC/7/2/18893>
- Nakhi A, Srinivas PV, Rahman MS, Kishore R, Seerapu GPK, Kumar KL, et al. Amberlite IR-120H catalyzed MCR: design, synthesis and crystal structure analysis of 1,8-dioxo-decahydroacridines as potential inhibitors of sirtuins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2013;23(6):1828–1833. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.01.026>
- Shchekotikhin YuM, Nikolaeva TG, Shub GM, Kriven'ko AP. Synthesis and antibacterial activity of substituted 1,8-dioxodecahydroacridines. *Pharmaceu-*

tical Chemistry Journal. 2001;35(4):206–211.

14. Jezek J, Sebestic J, Hlavacek J. *Biomedical applications of acridines: derivatives, syntheses, properties and biological activities a focus on neurodegenerative diseases*. Springer International Publishing AG; 2017. 236 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-63953-6>

15. Pesyan NN, Akhteh N, Batmani H, Anil B, Şahin E. A facile and catalyst-free synthesis of hexahydroacridine-1,8(2H,5H)-dione and octahydroacridin-10(1H)-ylthiourea derivatives: Inter- and Intramolecular Aza-Michael addition. *Heterocyclic Communications*. 2020;26(1):26–32. <https://doi.org/10.1515/hc-2020-0005>

16. Pyrko AN. Synthesis and biological testing for pesticidal activity of 9-aryl-n-aryl, alkyl-substituted 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridine-1,8-dione derivatives. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017;7(2):16–20. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-1-16-20>

17. Gutsulyak KV, Manzhara VS, Mel'nik MV,

Kalin TI. Relationship between the structure and photostability of decahydroacridine derivatives. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2005;72(4):488–494. <https://doi.org/10.1007/s10812-005-0102-9>

18. Pyrko AN. Synthesis and transformations of new 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridine-1,8-dione derivatives. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2008;44(8):1215–1224. <https://doi.org/10.1134/S1070428008080198>

19. Beletskaya IP, Kustov LM. Catalysis as an important tool of green chemistry. *Russian Chemical Reviews*. 2010;79(6):493–515. <https://doi.org/10.1070/RC2010v079n06ABEH004137>

20. Christian GD, Dasgupta PK, Schug KA. *Analytical chemistry*. 7th revised ed. Washington: Wiley; 2013. 848 p.

21. Shchekotikhin YuM, Nickolaeva TG. Characteristics of the dissociative ionization of 9-aryl(hetaryl)-3,3,6,6-tetra-methyldecahydroacridine-1,8-diones under the influence of electron impact. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2004;40(8):1031–1035. <https://doi.org/10.1023/B:COHC.0000046693.85136.ac>

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ozols Ya.Ya., Pyrko A.N., Lakhvich F.A., Vigante V.A., Dubure R.R., Dubur G.Ya., et al. Synthesis of decahydrophenanthridine-1,7-dione and hexahydroisoquinol-8-one derivatives in the reaction of 2-acetyl-2-cyclohexene-1-ones with conjugated enamino-carbonyl compounds // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 1990. Vol. 26. Issue 1. P. 58–62. <https://doi.org/10.1007/BF00506849>

2. Ozols Ya.Ya., Pyrko A.N., Vigante B.A., Dubure R.R., Dubur G.Ya. Synthesis of phenyl-substituted derivatives of decahydro-1,7-phenanthridinedione and hexahydro-8-isoquinolone // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 1992. Vol. 28. Issue 5. P. 530–534. <https://doi.org/10.1007/BF00475250>

3. Milkovic L., Vukovic T., Zarkovic N., Tatzber F., Bisenieks E., Kalme Z., et al. Antioxidative 1,4-dihydropyridine derivatives modulate oxidative stress and growth of human osteoblast-like cells *in vitro* // *Antioxidants*. 2018. Vol. 123. Vol. 7. Issue 9. P. 1–23. <https://doi.org/10.3390/antiox7090123>

4. Mishnev A., Bisenieks E., Mandrika I., Petrovskaya R., Kalme Z., Bruverea I., et al. Crystal structure and metabolic activity of 4-(thien-2-yl)-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxylic acid ethoxycarbonylphenyl-methylester // *Acta Crystallographica. Section E*. 2018. Vol. E74. P. 1577–1579. <https://doi.org/10.1107/S2056989018014251>

5. Shekari F., Sadeghpour H., Javidnia K., Saso L., Nazari F., Firuzi O., et al. Cytotoxic and multi-drug resistance reversal activities of novel 1,4-dihydropyridines against human cancer cells // *European Journal of Pharmacology*. 2015. Vol. 746. P. 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.058>

6. Velená A., Zarkovic N., Troselj K.G., Bisenieks E., Krauze A., Poikans J., et al. 1,4-Dihydropyridine

derivatives: dihydronicotinamide analogues – model compounds targeting oxidative stress // *Oxidative Medicine Cellular Longevity*. 2016. Vol. 216. Article ID 1892412. <https://doi.org/10.1155/2016/1892412>

7. Marjani A.P., Khalafy J., Chitan M., Mahmoodi S. Microwave-assisted synthesis of acridine-1,8(2H,5H)-diones via a one-pot, three component reaction // *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2017. Vol. 36. Issue 2. P. 1–6.

8. Nalini V., Girija R. Synthesis, characterization and biological studies of 9-aryl substituted acridinedione derivatives by Hantzsch condensation // *International Journal of Current Research*. 2013. Vol. 5. Issue 10. P. 3076–3081.

9. Safaei-Ghomi J., Ghasemzadeh M.A., Zahedi S. ZnO nanoparticles: a highly effective and readily recyclable catalyst for the one-pot synthesis of 1,8-dioxo-decahydroacridine and dioxooctahydroxanthene derivatives // *Journal of the Mexican Chemical Society*. 2013. Vol. 57. Issue 1. P. 1–7.

10. Xia J.-J., Zhang K.-H. Synthesis of N-substituted acridinediones and polyhydroquinoline derivatives in refluxing water // *Molecules*. 2012. Vol. 17. Issue 5. P. 5339–5345. <https://doi.org/10.3390/molecules17055339>

11. Kalalawe V.G., Munde R.D., Kagne R.P., Niwadange S.N., Gutte R.D. Synthesis of acridine derivatives using ionic liquid as promoter // *International Journal of Green and Herbal Chemistry. Sec. B*. 2018. Vol. 7. Issue 2. P. 188–193. <https://doi.org/10.24214/IJGHC/GC/7/2/18893>

12. Nakhi A., Srinivas P.V., Rahman M.S., Kishore R., Seerapu G.P.K., Kumar K.L., et al. Amberlite IR-120H catalyzed MCR: design, synthesis and crystal structure analysis of 1,8-dio-

xodecahydroacridines as potential inhibitors of sirtuins // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 2013. Vol. 23. Issue 6. P. 1828–1833. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.01.026>

13. Shchekotikhin Yu.M., Nikolaeva T.G., Shub G.M., Kriven'ko A.P. Synthesis and antibacterial activity of substituted 1,8-dioxodecahydroacridines // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2001. Vol. 35. Issue 4. P. 206–211.

14. Jezek J., Sebestic J., Hlavacek J. Biomedical applications of acridines: derivatives, syntheses, properties and biological activities a focus on neurodegenerative diseases. Springer International Publishing AG. 2017. 236 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-63953-6>

15. Pesyan N.N., Akhteh N., Batmani H., Anil B., Şahin E. A facile and catalyst-free synthesis of hexahydroacridine-1,8(2H,5H)-dione and octahydroacridin-10(1H)-ylthiourea derivatives: Inter- and Intramolecular Aza-Michael addition // Heterocyclic Communications. 2020. Vol. 26. Issue 1. P. 26–32. <https://doi.org/10.1515/hc-2020-0005>

16. Пырко А.Н. Синтез и биологические испытания на пестицидную активность производных 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-декагидроакридиндиона-1,8 // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7. N 2. С. 16–20. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-1-16-20>

21285/2227-2925-2017-7-1-16-20

17. Gutsulyak K.V., Manzhara V.S., Mel'nik M.V., Kalin T.I. Relationship between the structure and photostability of decahydroacridine derivatives // Journal of Applied Spectroscopy. 2005. Vol. 72. Issue 4. P. 488–494. <https://doi.org/10.1007/s10812-005-0102-9>

18. Pyrko A.N. Synthesis and transformations of new 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahydroacridine-1,8-dione derivatives // Russian Journal of Organic Chemistry. 2008. Vol. 44. Issue 8. P. 1215–1224. <https://doi.org/10.1134/S1070428008080198>

19. Beletskaya I.P., Kustov L.M. Catalysis as an important tool of green chemistry // Russian Chemical Reviews. 2010. Vol. 79. Issue 6. P. 493–515. <https://doi.org/10.1070/RC2010v079n06ABEH004137>

20. Christian G.D., Dasgupta P.K., Schug K.A. Analytical chemistry; 7th revised ed. Washington: Wiley. 2013. 848 p.

21. Shchekotikhin Yu.M., Nikolaeva T.G. Characteristics of the dissociative ionization of 9-aryl(hetaryl)-3,3,6,6-tetra-methyldecahydroacridine-1,8-diones under the influence of electron impact // Chemistry of Heterocyclic Compounds. 2004. Vol. 40. Issue 8. P. 1031–1035. <https://doi.org/10.1023/B:COHC.0000046693.85136.ac>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anatoliyi N. Pyrko,

Cand. Sci. (Chemistry). Associate Professor, Environmental Chemistry and Biochemistry Department, International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, 23, Dolgobrodskaya St., Minsk, 220070, Belarus,
✉ e-mail: pyrko@yandex.ru

Contribution of the authors

Anatoliyi N. Pyrko carried out the experimental work, analyzed the experimental results and prepared the text of the manuscript. Author has exclusive author's right and bear responsibility for plagiarism.

Conflict interests

The author declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by the author.

Статья поступила в редакцию 28.10.2020; одобрена после рецензирования 27.11.2020; принята к публикации 30.11.2020.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Пырко Анатолий Николаевич,

к.х.н., доцент кафедры экологической химии и биохимии, Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, 220070, г. Минск, ул. Долгобродская, 23/1, Республика Беларусь,
✉ e-mail: pyrko@yandex.ru

Заявленный вклад авторов

Пырко А.Н. выполнил экспериментальную работу, обобщил полученные результаты и написал рукопись. Автор имеет на статью исключительные авторские права и несет ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Автор прочел и одобрил окончательный вариант рукописи.

The article was submitted 28.10.2020; approved after reviewing 27.11.2020; accepted for publication 30.11.2020.

Оригинальная статья / Original article

УДК 66.067.8.081.3 + 66.011

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-564-572>



Компьютерное моделирование закономерностей сорбции ионов тяжелых металлов серосодержащим модифицированным цеолитом

© В.С. Асламова*, Л.В. Шалунц**, А.А. Асламов***, В.А. Грабельных****

*Иркутский государственный университет путей сообщения, г. Иркутск, Российская Федерация,

**Центр охраны окружающей среды ВСЖД – филиал ОАО «РЖД», г. Иркутск, Российская Федерация

***Ангарский государственный технический университет, г. Ангарск, Российская Федерация,

****Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: Рассмотрены комплексно-хелатный и комплексно-координационный механизмы сорбции серосодержащими сорбентами по отношению к ионам тяжелых металлов, которые обладают сродством с атомами серы. Показаны преимущества и недостатки серосодержащих сорбентов, полученных модификацией природных материалов. В среде Statgraphics Plus выполнен анализ применимости классических линеаризованных уравнений Фрейндлиха и Ленгмюра для описания изотерм адсорбции ионов цинка, меди и никеля из водных растворов цеолитом Холинского месторождения модифицированным серосодержащим полимером. Показано, что изотермы сорбции Zn^{2+} исследованным сорбентом довольно точно описываются классическим уравнением Фрейндлиха при температуре водного раствора от 20 до 40 °С, а изотермы Ni^{2+} – $T = 20$ °С. Использование уравнения Фрейндлиха для описания изотерм сорбции Cu^{2+} нецелесообразно ввиду его невысокой точности. Наиболее применимы для названных целей регрессионные модели аппроксимации экспоненциальных данных или линеаризованное уравнение Ленгмюра. Показано, что уравнение Ленгмюра при температурах водного раствора 20, 40 и 60 °С описывает соответственно 99,35; 98,41 и 92,12% экспериментальных величин сорбции Cu^{2+} . Отмечено, что с увеличением температуры модельного раствора константа равновесия и равновесная адсорбционная емкость возрастают, а точность описания изотерм убывает. Изотермы сорбции Zn^{2+} , Ni^{2+} не подчиняются уравнению Ленгмюра, что можно объяснить с привлечением теории «жестких» и «мягких» кислот и оснований Пирсона, согласно которой ионы Zn^{2+} и Ni^{2+} относятся к кислотам промежуточной жесткости, а ион Cu^{2+} – к «мягким» кислотам, которые образуют наиболее прочные соединения с мягкими основаниями (атомами серы полимера). Ионы Zn^{2+} и Ni^{2+} связываются не только с атомами серы, но и с атомами кислорода (жесткое основание) цеолитной матрицы и могут перемещаться по поверхности сорбента «в поиске более удобных для координации мест». Таким образом, для ионов Zn^{2+} и Ni^{2+} нарушается один из принципов теории Ленгмюра – локализация сорбата на поверхности сорбента. Видимо, по этой причине уравнение Ленгмюра для них «не работает».

Ключевые слова: цинк, медь, никель, модифицированный цеолит Холинского месторождения, серосодержащий полимер, механизм сорбции, уравнение Фрейндлиха, уравнение Ленгмюра

Для цитирования: Асламова В.С., Шалунц Л.В., Асламов А.А., Грабельных В.А. Компьютерное моделирование закономерностей сорбции ионов тяжелых металлов серосодержащим модифицированным цеолитом. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 4. С. 564–572. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-564-572>

Computer simulation of the sorption of heavy metal ions by a sulphur-containing modified zeolite

Vera S. Aslamova*, Liana V. Shalunc**, Alexander A. Aslamov***, Valentina A. Grabel'nykh****

* Irkutsk State Transport University, Irkutsk, Russian Federation

** Center of environmental protection of East-Siberian Railway – branch of OJSC “RRW”, Irkutsk, Russian Federation

*** Angarsk State Technical University, Angarsk, Russian Federation

**** A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: This paper considers complex-chelating and complex-coordinating mechanisms of sorption of heavy metal ions, which have an affinity for sulphur atoms, by sulphur-containing sorbents. The advantages and disadvantages of sulphur-containing sorbents obtained by modification of natural materials are shown. The STATGRAPHICS Plus environment was used to analyse the applicability of classical linearized Freundlich and Langmuir equations for describing the adsorption isotherms of zinc, copper and nickel ions from aqueous solutions by the Kholinsky zeolite modified with a sulphur-containing polymer. It is shown that the classical Freundlich equation accurately describes the sorption isotherms of Zn^{2+} and Ni^{2+} by the sorbent under study at the aqueous solution temperatures of 20–40 °C and 20 °C, respectively. The use of the Freundlich equation to describe the sorption isotherms of Cu^{2+} is impractical due to its low accuracy. For this purpose, regression models for approximating experimental data or a linearized Langmuir equation are more suitable. It is shown that the Langmuir equation describes 99.35, 98.41 and 92.12% of the experimental values of Cu^{2+} sorption at the aqueous solution temperatures of 20, 40 and 60 °C, respectively. It was established that an increase in the temperature of the model solution leads to an increase in the equilibrium constant and equilibrium adsorption capacity, at the same time as decreasing the accuracy of isotherm description. The sorption isotherms of Zn^{2+} and Ni^{2+} do not obey the Langmuir equation, which can be explained by the Pearson acid-base concept (HSAB). According to this concept, Zn^{2+} and Ni^{2+} ions are acids of intermediate hardness, while Cu^{2+} ions refer to 'soft' acids capable of forming the strongest compounds with 'soft' bases (polymer sulphur atoms). Zn^{2+} and Ni^{2+} ions bind not only to sulphur atoms, but also to oxygen atoms ('hard' base) of the zeolite matrix, thus moving along the sorbent surface in search of sites more convenient for coordination. Therefore, for Zn^{2+} and Ni^{2+} ions, one of the basic principles of the Langmuir theory is violated, i.e. localization of the sorbate on the sorbent surface. Apparently, it is for this reason that the Langmuir equation is not applicable for describing the Zn^{2+} and Ni^{2+} sorption.

Keywords: zinc, copper, nickel, modified zeolite of the Kholinsky deposit, sulphur-containing polymer, sorption mechanism, Freundlich equation, Langmuir equation

For citation: Aslamova VS, Shalunc LV, Aslamov AA, Grabelnykh VA. Computer simulation of the sorption of heavy metal ions by a sulphur-containing modified zeolite. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):564–572. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-564-572>

ВВЕДЕНИЕ

Адсорбционные процессы играют важную роль при решении экологических задач. Особенно они актуальны при извлечении ионов тяжелых металлов (ИТМ) из сточных вод, так как позволяют снизить их остаточное содержание до требований нормативов.

Согласно общим положениям современной токсикологии [1], ИТМ относятся к тиоловым ядам, поскольку их токсическое действие основано на блокировании серосодержащих групп, входящих в состав белковых молекул. На принципе сродства ИТМ с атомами серы органических молекул базируется создание экстрагентов, которые используются в процессах выделения металлов из технологических растворов¹ [2].

Еще в середине прошлого века для поглощения ИТМ были получены полимерные материалы, содержащие группы –SH и –S–, которые образуют с ИТМ хелатные комплексы [3–5] (рис. 1).

Сорбция с использованием полимерных хелатообразующих сорбентов протекает по хелатному (комплексному) механизму. Однако такие сорбенты являются довольно дорогостоящими и используются лишь в аналитической химии [4, 5].

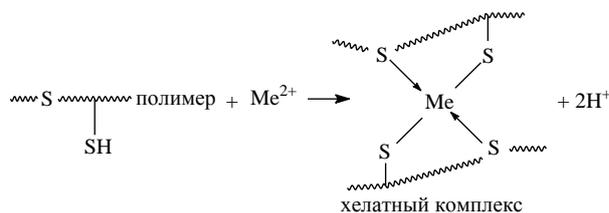


Рис. 1. Комплексно-хелатный механизм сорбции ионов тяжелых металлов

Fig. 1. Complex chelating mechanism of sorption of heavy metal ions

Дальнейшими исследованиями было показано, что и серосодержащие сорбенты, в которых отсутствует меркапто-группа (–SH), также способны к комплексообразованию с ИТМ. Сорбция ИТМ в этих случаях также происходит с образованием комплексов, но все связи в них имеют координационную природу [6], поэтому такой механизм получил название «комплексно-координационный» механизм (рис. 2).

Теория адсорбции разработана, в основном, для систем «газ – твердое» [7]. А адсорбция в системе «жидкость – твердое» является одним из наиболее сложных, с математической точки

¹Родионов А.И., Клушин В.Н., Систер В.Г. Технологические процессы экологической безопасности основы энвайронменталистики): учебник для студентов технических и технологических специальностей; 3-е изд., перераб. и доп. Калуга: Изд-во Н. Бочкаревой, 2000. 800 с.

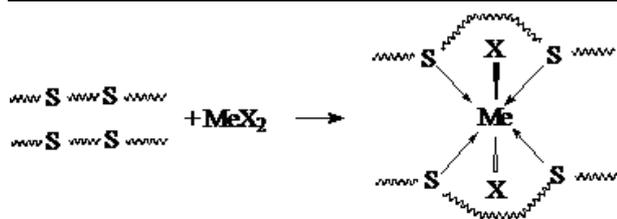


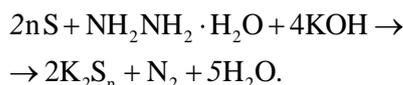
Рис. 2. Комплексно-координационный механизм сорбции
 Fig. 2. Complex coordination mechanism of sorption

зрения, процессов химической технологии. Особенно трудно теоретически описать процесс извлечения ИТМ из сточных вод твердыми адсорбентами, которые функционируют по комплексно-координационному механизму сорбции.

Методы получения полисульфидных полимеров весьма разнообразны [8]. Однако большинство полисульфидных полимеров представляет собой каучукоподобные вещества, которые не могут быть использованы в качестве сорбентов и применяются главным образом в качестве герметиков [9].

Перспективным оказалось получение сорбентов путем нанесения сетки серосодержащего полимера на твердую поверхность диспергированных частиц. В качестве центров поликонденсации были использованы частицы золошлакового материала [10] или раздробленного кокса [11, 12].

Полисульфидный полимер в перечисленных и других подобных случаях получен путем использования элементной серы (отхода нефтехимических производств и некоторых отраслей металлургии), которую растворяли в системе «гидразингидрат – щелочь»:



При получении полисульфидных герметиков серу растворяют просто в щелочи [9]:



Однако в этом случае часть серы переходит в состояние SO_3^{2-} . Присутствие этих анионов увеличивает засоленность сточных вод при синтезе полимеров.

Авторы работ [10–12] получали полисульфидный полимер, покрывающий твердые частицы, поликонденсацией анионов SO_n^{2-} , адсорбированных на поверхности частиц твердой фазы, с отходами хлорорганических производств, в частности, производства эпихлоргидрина (важного мономера для получения эпоксидных смол). Главный компонент отхода – 1,2,3-трихлорпропан (рис. 3).

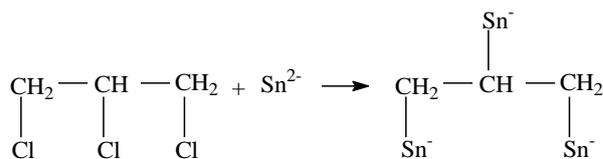


Рис. 3. Схема получения полисульфидного полимера
 Fig. 3. Scheme of a polysulfide polymer preparation

Полученный из золошлакового материала сорбент обладает хорошими технологическими характеристиками: низкое гидравлическое сопротивление, отсутствие слеживаемости, невысокая стоимость (поскольку получен из отходов производства). Однако такой сорбент имеет недостаточно хорошую сорбционную активность: для Zn_n^{2-} – 32 мг/г; для Cu_n^{2-} – 25 мг/г [10]. Кроме того, некоторые примеси токсичных металлов, присутствующие в золе и шлаке (например, соединения ванадия), могут переходить в сточные воды.

Для сорбентов, полученных с использованием нефтекокса, сорбционная активность составляет: для Zn_n^{2-} – до 72 мг/г; для Cu_n^{2-} – до 50 мг/г [11, 12]. Полученные сорбенты показали высокое значение теплоты сорбции (до 623 кДж/моль для ионов Cu_n^{2-}), что, по мнению авторов работы [12], служит дополнительным доказательством комплексно-координационного механизма сорбции.

Авторами работ [13, 14] серосодержащий сорбент получен также с использованием твердого отхода лесохимии – лигнина. Сорбент показал высокие адсорбционные характеристики, однако имел высокую дисперсность, которая придает ему при использовании большое гидравлическое сопротивление.

Таким образом, нанесение серосодержащего полимера на твердые частицы исследуется достаточно интенсивно. Но до настоящих исследований цеолиты в качестве центров поликонденсации при нанесении на их поверхность полисульфидных полимеров не использовались, хотя примеры их модификации другими полимерами, не содержащими серу (полиэтиленгликоль, себацинат, хитозан, полигексаметиленгуанидин), в технической литературе есть. Поскольку эта модификация направлена не на увеличение адсорбции ИТМ, в данном исследовании она не рассматривалась.

Возможной причиной отсутствия данных по модификации цеолита серосодержащим полимером является невозможность сорбции анионов (в нашем случае S_n^{2-}) цеолитами [15]. Поэтому в дальнейшем для такой модификации цеолита нами был использован специальный прием, заключающийся в замене щелочи (NaOH или KOH) на органическое основание – моноэтаноламин, который также используется для генерирования из серы анионов S_n^{2-} [16].

Цель настоящего исследования – моделирование процесса адсорбции в системе «твердое – жидкость», анализ применимости уравнений Фрейндлиха и Ленгмюра для описания изотерм адсорбции ионов цинка, меди и никеля из водных растворов цеолитом Холинского месторождения, модифицированным серосодержащим полимером.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Новый сорбент получен модификацией цеолита клиноптилолитового типа Холинского месторождения серосодержащим полимером [17, 18].

Следует учитывать, что цеолиты, в отличие от нефтекоса, обладают высокой теплотой гидратации – 2650 кДж/кг [15, 19], поэтому при их использовании теплота адсорбции может быть невысокой, что и было обнаружено экспериментально (поэтому в дальнейшем этот вопрос не обсуждается).

Экспериментальное исследование сорбции ИТМ выполняли по следующей методике. Шейкером S-3.02.08.M встряхивали 3 ч навеску модифицированного цеолита массой 0,2 г с соевым раствором исследуемого металла объемом 20 мл. Концентрация оставшихся ИТМ определялась дитизионовым методом с помощью анализатора жидкости Флюорат-02 [20]. Величину C_k ионов Cu определяли фотометрическим методом на фотоколориметре КФК-3-30МЗ. Для снятия изотерм сорбции в статических условиях использовали метод постоянных навесок сорбента с разными C_0 ИТМ.

Значение величины сорбции A , мг/г, оценивалось по изменению содержания ИТМ в бидистиллированном водном растворе:

$$A = V(C_0 - C_k) / m,$$

где C_0 и C_k – начальная и конечная концентрации ионов металлов в растворе соответственно, мг/л.

Выполнен большой объем экспериментальных исследований. Для рассматриваемых ИТМ установили оптимальные значения всех влияющих на сорбцию параметров (рН, C_0 , температура раствора, время сорбции), которые обеспечивают наибольшие значения сорбционной емкости разработанного сорбента [17, 18, 21–23].

Для всех ИТМ использовался водный раствор с рН = 3, получаемый при разведении бидистиллированной водой модельных государственных стандартных образцов исследуемых солей до нужной концентрации. Проводили не менее трех экспериментов для каждого значения C_0 . При отклонении результатов эксперимента более чем на 10% осуществлялись дополнительные опыты. Точки, представленные на графиках, – среднеарифметическое значение экспериментальных данных.

Параметры линеаризованных уравнений Фрейндлиха и Ленгмюра находили в пакете Statgraphics Plus. Достоверность моделей оценивали по величине коэффициента детерминации R^2 , который определяет процент экспериментальных данных, соответствующих выбранному теоретическому уравнению.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Линеаризованное уравнение Фрейндлиха, описывающее изотерму адсорбции, записывается в виде равенства [7]:

$$\lg A = \lg K + \frac{1}{n} \lg C_0. \quad (1)$$

Значения параметров уравнения (1) находили с использованием пакета Statgraphics Plus. Была получена линейная регрессия, описывающая изотерму сорбции Cu^{2+} (рис. 4). Коэффициент R^2 , %, указан в табл. 1.

$$\lg A = 0,959 + 0,149 \lg C_0 \quad (2)$$

$$\lg K = 0,959 \rightarrow K = 10^{0,959} = 9,093; \quad \frac{1}{n} = 0,149 \rightarrow n = 9,093.$$

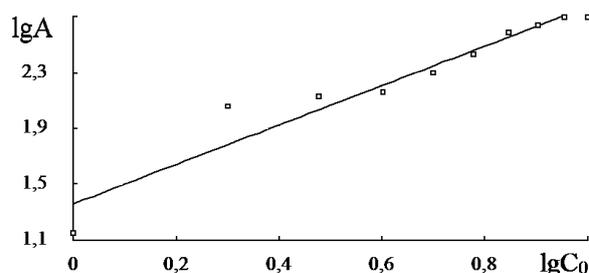


Рис. 4. Аппроксимации экспериментальной изотермы адсорбции Cu(II) линеаризованным уравнением Фрейндлиха (2)

Fig. 4. Approximations of the experimental adsorption isotherm of Cu (II) by the linearized Freundlich equation (2)

О достоверности регрессии можно также судить по рис. 5, на котором приведено сравнение экспериментальных значений $\lg A_э$, мкг/г, со значениями $\lg A_p$, вычисленными по модели (2).

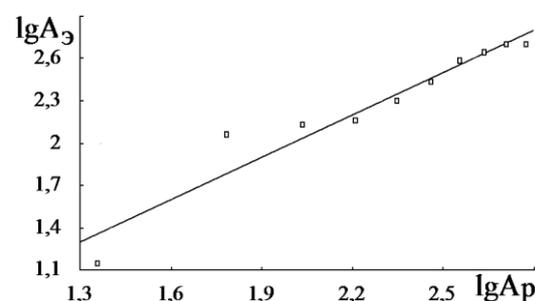


Рис. 5. Сопоставление вычисленных значений $\lg A_p$ по модели (2) с $\lg A_э$

Fig. 5. Comparison of the calculated values of $\lg A_p$ according to model (2) with $\lg A_э$

Таблица 1. Значение параметров уравнения Фрейндлиха
 Table 1. Freundlich equation parameter values

Катион	Температура, T, °C								
	20			40			60		
	k	n	R ² , %	k	n	R ² , %	k	n	R ² , %
Zn ²⁺	101,531	1,038	93,20	101,368	1,038	93,20	114,196	1,117	89,31
Ni ²⁺	22,767	0,706	92,76	67,019	0,832	81,23	100,302	0,947	77,56
Cu ²⁺	9,093	6,702	88,14	18,271	2,892	71,37	20,873	2,484	65,78

Линеаризованное уравнение Ленгмюра представлено в координатах C₀/A, C₀ [7]:

$$\frac{C_0}{A} = \frac{1}{A_\infty \cdot K_{\text{равн}}} + \frac{1}{K_{\text{равн}}} C_0 \quad (3)$$

Уравнение (3) аппроксимировано линейной регрессией:

$$\frac{C_0}{A} = 0,001 + 0,151 C_0 \quad (4)$$

$$\frac{1}{K_{\text{равн}}} = 0,151 \rightarrow K_{\text{равн}} = 150,6;$$

$$\frac{1}{A_\infty \cdot K_{\text{равн}}} = 0,001 \rightarrow A_\infty = \frac{1}{0,001 \cdot K_{\text{равн}}} = 6,640.$$

График регрессии (4) представлен на рис. 6. Коэффициент R² регрессии (4) указан в табл. 2.

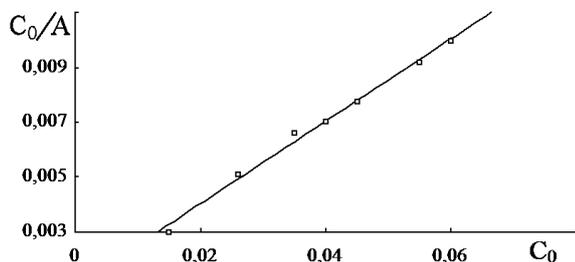


Рис. 6. Аппроксимация экспериментальной изотермы адсорбции Cu(II) линеаризованным уравнением Ленгмюра (4)

Fig. 6. Approximation of the experimental adsorption isotherm of Cu (II) by the linearized Langmuir equation (4)

О достоверности регрессии можно также судить по рис. 7, на котором представлено сравнение экспериментальных значений C₀/A_э с вычисленными по модели (4) значениями C₀/A_р.

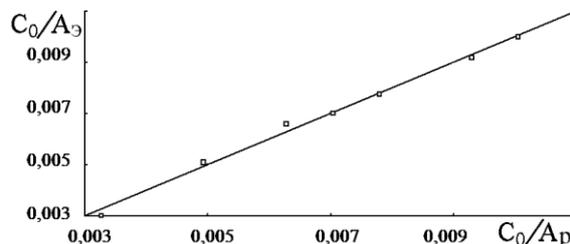


Рис. 7. Сопоставление значений C₀/A_р, вычисленных по модели (4), с экспериментальными данными C₀/A_э

Fig. 7. Comparison of calculated values of C₀/A_р according to model (4) with experimental data of C₀/A_э

Аппроксимация экспериментальной изотермы адсорбции Ni(II) при температуре 20 °C, pH = 3 уравнением Фрейндлиха представлена на рис. 8 и описывается регрессией:

$$\lg A = 1,357 + 1,416 \lg C_0 \quad (5)$$

$$\lg K = 1,357 \rightarrow K = 10^{1,357} = 22,767;$$

$$\frac{1}{n} = 1,416 \rightarrow n = 0,706.$$

Коэффициент R² для равенства (5) указан в табл. 1/

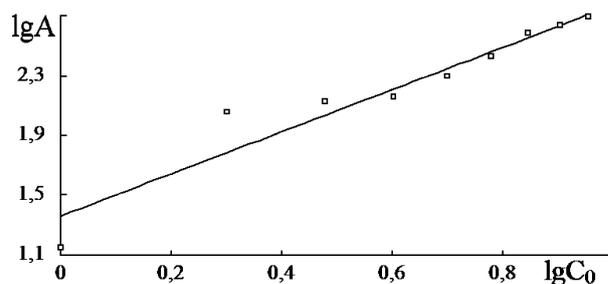


Рис. 8. Аппроксимация экспериментальной изотермы адсорбции Ni(II) уравнением Фрейндлиха в логарифмических координатах

Fig. 8. Approximation of the experimental adsorption isotherm of Ni(II) by the Freundlich equation in logarithmic coordinates

Таблица 2. Значение параметров уравнения Ленгмюра
 Table 2. Langmuir equation parameter values

Катион	Температура, T, °C								
	20			40			60		
	A [∞] , мкг/г	K равновес.	R ² , %	A [∞] , мкг/г	K равновес.	R ² , %	A [∞] , мкг/г	K равновес.	R ² , %
Zn ²⁺	Не описывается		12,26	Не описывается		12,26	Не описывается		29,10
Ni ²⁺	Не описывается		32,94	Не описывается		6,60	Не описывается		0,24
Cu ²⁺	6,640	150,6	99,35	6,636	206,438	98,41	7,640	76,099	92,12

О достоверности регрессии можно также судить по рис. 9, на котором представлено сравнение экспериментальных значений $\lg A_e$, мг/г, с вычисленными по модели (5) значениями $\lg A_p$.

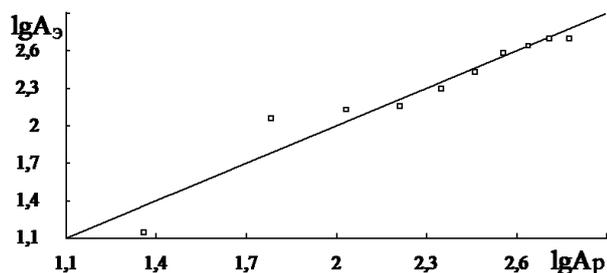


Рис. 9. Сопоставление вычисленных значений $\lg A_p$ по модели (5) с экспериментальными данными $\lg A_e$

Fig. 9. Comparison of the calculated values of $\lg A_p$ according to model (5) with experimental data of $\lg A_e$

Аппроксимация экспериментальной изотермы адсорбции Zn(II) при температуре 20 °С, pH = 3 уравнением Фрейндлиха представлена на рис. 10 и описывается регрессией:

$$\lg A = 2,006 + 0,964 \lg C_0 \quad (6)$$

$$\lg K = 2,006 \rightarrow K = 10^{2,006} = 101,531;$$

$$\frac{1}{n} = 0,964 \rightarrow n = 1,0378.$$

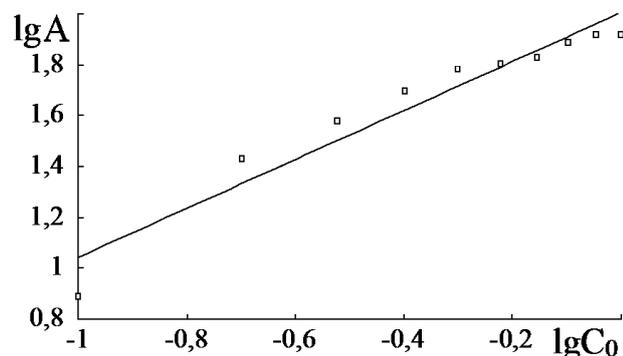


Рис. 10. Аппроксимация экспериментальной изотермы адсорбции ионов Zn(II) линейризованным уравнением Фрейндлиха (6)

Fig. 10. Approximations of the experimental adsorption isotherm of Zn(II) by the linearized Freundlich equation (6)

Коэффициент R^2 для регрессии (6) см. в табл. 1. О достоверности регрессии можно также судить по рис. 11, на котором представлено сравнение экспериментальных значений $\lg A_e$, мг/г, со значениями $\lg A_p$, вычисленными по модели (6).

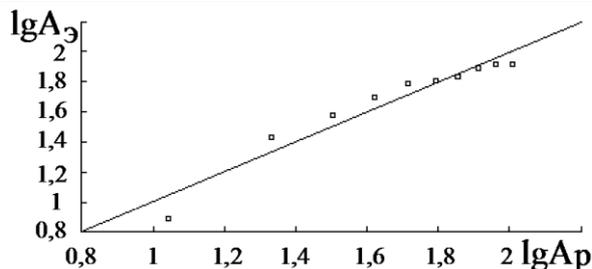


Рис. 11. Сопоставление вычисленных значений $\lg A_p$ по модели (6) с $\lg A_e$

Fig. 11. Comparison of the calculated values of $\lg A_p$ according to model (6) with $\lg A_e$

Аналогично изложенному было выполнено моделирование изотерм сорбции изучаемых ИТМ при температурах 40 и 60 °С. Результаты компьютерного исследования представлены в табл. 1 и 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что изотермы сорбции Zn^{2+} цеолитом Холинского месторождения модифицированным серосодержащим полимером довольно точно описываются классическим уравнением Фрейндлиха при температуре водного раствора от 20 до 40 °С, а изотермы Ni^{2+} – при $T = 20$ °С (см. табл. 1). Ввиду невысокого значения R^2 для описания изотерм сорбции Cu^{2+} уравнение Фрейндлиха использовать нецелесообразно. В этом случае лучше применять регрессионные модели аппроксимации экспериментальных данных [18, 21–23].

Изотермы сорбции Cu^{2+} модифицированным цеолитом Холинского месторождения достаточно точно описываются классическим уравнением Ленгмюра, что следует из данных, представленных в табл. 2. Причем с увеличением температуры модельного раствора константа равновесия и равновесная адсорбционная емкость возрастают, а точность описания убывает. Изотермы сорбции Zn^{2+} , Ni^{2+} не подчиняются уравнению Ленгмюра (R^2 не превышает 33%), что можно объяснить преобладанием комплексно-координационного механизма сорбции над ионнообменным.

Разницу в поведении ионов Cu^{2+} по сравнению с Zn^{2+} , Ni^{2+} можно объяснить с привлечением теории «жестких» и «мягких» кислот и оснований (ЖМКО) Пирсона, которая в настоящее время широко используется в химии координационных соединений [24, 25]. Согласно этому принципу, ионы Zn^{2+} , Ni^{2+} относятся к кислотам промежуточной жесткости, а ион Cu^{2+} некоторые авторы² относят также к кислотам промежуточной жесткости, а другие³ – к «мягким» кислотам Льюиса. Сообразно

²Скопенко В.В., Цивадзе А.Ю., Савранский Л.И., Гарноковский А.Д. Координационная химия: учеб. пособие. М.: ИКЦ «Академкнига», 2007. 487 с.

³Днепропровский А.С., Темникова Т.И. Теоретические основы органической химии: учеб. пособие. Л.: Химия, 1991. 560 с.

принципу ЖМКО «мягкие» кислоты дают наиболее прочные соединения с мягкими основаниями, поэтому ионы Cu^{2+} прочно связываются с атомами серы полимера, а ионы Zn^{2+} , Ni^{2+} связываются не только с атомами серы, но и с атомами кислорода (жесткое основание) цеолитной матрицы и могут

перемещаться по поверхности сорбента «в поиске более удобных для координации мест». Таким образом, для ионов Zn^{2+} , Ni^{2+} нарушается один из принципов теории Ленгмюра – локализация сорбата на поверхности сорбента. Видимо, по этой причине уравнение Ленгмюра для них «не работает».

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Общая токсикология / под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. М.: Медицина, 2002. 606 с.
2. Чекушин В.С., Борбат В.Ф. Экстракция благородных металлов сульфидами и сульфоксидами. М.: Наука, 1984. 152 с.
3. Зейналов Р.З., Татаева С.Д., Атаева Н.И. Концентрирование и определение меди, цинка и кадмия хелатообразующим модифицированным сорбентом // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17. № 1. С. 89–96.
4. Мясоедова Г.В., Саввин С.Б. Хелатообразующие сорбенты. М.: Наука, 1984. 171 с.
5. Burba P. Anion exchangers functionalized by chelating agents (AnChel) for preconcentration of trace elements: capabilities and limitations // Fresenius Journal Analytical Chemistry. 1991. Vol. 341. Issue 12. P. 709–715. <https://doi.org/10.1007/BF00321572>
6. Рафиков С.Р. Особенности свойств серосодержащих полимеров // Высокмолекулярные соединения. 1979. Т. (А) XXI. N 11. С. 2518–2528.
7. Товбин Ю.К. Молекулярная теория адсорбции в пористых телах: монография. М.: Физматлит, 2013. 624 с.
8. Lucke H. Aliphatic Polysulfides. Publisher Hu-thing & Wepf, Verlag Basel, 1994.
9. Хакимуллин Ю.Н., Минкин В.С., Полютин Ф.М., Дербердеев Т.Р. Герметики на основе полисульфидных олигомеров: синтез, свойства, применение. М.: Наука, 2007. 300 с.
10. Дарманская Т.А., Корчевин Н.А., Асламова В.С. Утилизация зольных отходов // Экология и промышленность России. 2010. N 1. С. 39–41.
11. Пат. № 2475299. Российская Федерация. Способ получения серосодержащих сорбентов для очистки сточных вод от тяжелых металлов / А.В. Рединова, О.Н. Игнатова, В.А. Грабельных, Е.П. Леванова, Н.В. Руссавская, С.В. Терек [и др.]; заявитель и патентообладатель Иркутский государственный университет путей сообщения; заявл. 27.12.2010; опубл. 20.02.2013. Бюл. № 5.
12. Рединова А.В., Грабельных В.А., Леванова Е.П., Корчевин Н.А. Извлечение ионов тяжелых металлов серосодержащими полимерными сорбентами // Вестник Иркутского государственного технического университета. 2013. N 1 (72). С. 113–116.
13. Чернышева Е.А., Грабельных В.А., Леванова Е.П., Руссавская Н.В., Розенцвейг И.Б., Корчевин Н.А. Новый подход к реализации адсорбционных свойств лигнина: получение серосодержащих сорбентов для ионов тяжелых металлов // Химия в интересах устойчивого развития. 2017. Т. 25. Вып. 3. С. 327–332. <https://doi.org/10.15372/>
14. Пат. № 2558896, Российская Федерация. Способ получения сорбента для очистки сточных вод от соединений тяжелых металлов / Е.А. Чернышева, В.А. Грабельных, Е.П. Леванова, О.Н. Игнатова, И.Б. Розенцвейг, Руссавская Н.В. [и др.]; заявл. 06.06.2014; опубл. 10.08.2015. Бюл. № 22.
15. Челищев Н.Ф., Беренштейн Б.Г., Володин В.Ф. Цеолиты – новый тип минерального сырья. М.: Недра, 1987. 82 с.
16. Deryagina E.N., Levanova E.P., Grabel'nykh V.A., Sukhomazova E.N., Russavskaya N.V., Korchevin N.A. Thiylation of polyelectrophiles with sulfur in hydrazine – hydrate – amine systems // Russian Journal of General Chemistry. 2005. Vol. 75. Issue 2. P. 194–199. <https://doi.org/10.1007/s11176-005-0197-y>
17. Пат. № 2624319, Российская Федерация. Способ получения сорбента для извлечения соединений тяжелых металлов из сточных вод / М.В. Обуздина, Е.А. Руш, А.В. Днепровская, Л.В. Шалуниц, О.Н. Игнатова, Е.П. Леванова, В.А. [и др.]; заявитель и патентообладатель Иркутский государственный университет путей сообщения; заявл. 30.03.2016; опубл. 03.07.2017. Бюл. № 19.
18. Асламова В.С., Шалуниц Л.В., Обуздина М.В., Грабельных В.А. Моделирование процесса адсорбции в системе жидкость – твердое тело: регрессионный анализ извлечения меди из водных растворов цеолитом Холинского месторождения, модифицированным серосодержащим полимером // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N 2. С. 351–359.
19. Карнаухов А.П. Адсорбция. Текстура дисперсных и пористых материалов: монография. Новосибирск: Наука, 1999. 470 с.
20. Марченко З. Фотометрическое определение элементов / пер. с польского И.В. Матвеевой, А.А. Немодрука; под ред. Ю.А. Золотова. М.: Мир, 1971. 502 с.
21. Асламова В.С., Шалуниц Л.В., Обуздина М.В., Руш Е.А. Регрессионные модели извлечения ионов никеля из водных растворов модифицированным цеолитом // Математические методы в технике и технологиях (ММТТ-31): сб. тр. XXXI Междунар. науч. конф. (г. Санкт-Петербург, 10–14 сентября 2018 г.). В 12 т. Т. 10. СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2018. С. 37–40.
22. Асламова В.С., Шалуниц Л.В., Грабельных В.А., Асламов А.А. Регрессионные модели процесса адсорбции ионов цинка из водных растворов цеолитом Холинского месторождения, мо-

дифицированным серосодержащим полимером // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 1. С. 29–38. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-1-29-38>

23. Aslamova V.S., Chernysheva E.A., Grabelnykh V.A., Levanova E.P., Russavskaya N.V. Regression analysis of the regularities of extraction of zinc and cadmium ions from aqueous solutions with a sulfur-based sorbent based on lignin // Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.

2018. Vol. 8. No. 4. P. 174–183. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-4-174-183>

24. Мамонова М.В., Прудников В.В., Прудникова И.А. Физика поверхности. Теоретические модели и экспериментальные методы: монография. М.: Физматлит, 2011. 400 с.

25. Кукушкин В.Ю., Кукушкин Ю.Н. Теория и практика синтеза координационных соединений: монография. Л.: Наука, 1990. 259 с.

REFERENCES

1. *General toxicology*. Kurlyandskii BA, Filov VA (eds.) Moscow: Meditsina; 2002. 606 p. (In Russian)

2. Chekushin VS, Borbat VF. *Extraction of noble metals by sulfides and sulfoxides*. Moscow: Nauka; 1984. 152 p. (In Russian)

3. Zeynalov RZ, Tatayeva SD, Atayeva NI. Preconcentration and determination of copper, zinc and cadmium chelating modified sorbent. *Analitika i kontrol = Analytics and Control*. 2013;17(1):89–96. (In Russian)

4. Myasoedova GV, Savvin SB. *Chelating sorbents*. Moscow: Nauka; 1984. 171 p. (In Russian)

5. Burba P. Anion exchangers functionalized by chelating agents (AnChel) for preconcentration of trace elements: capabilities and limitations. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1991;341(12):709–715. <https://doi.org/10.1007/BF00321572>

6. Rafikov SR. Peculiarities of properties of Sulphur containing polymers. *Vysokomolekulyarnye soedineniya = Polymer Science. Series A*. 1979;21(11):2518–2528. (In Russian)

7. Tovbin Yu.K. *Molecular Theory of Adsorption in Porous Bodies*. Moscow: Fizmatlit; 2013. 624 p. (In Russian)

8. Lucke H. *Aliphatic Polysulfides*. Publisher Huthing & Wepf, Verlag Basel; 1994.

9. Hakimullin YuN, Minkin VS, Polyutin FM, Derberdeev TR. *Sealants based on polysulfide oligomers. Synthesis, properties, application*. Moscow: Nauka; 2007. 301 p. (In Russian)

10. Darmanskaya TA, Korchevin NA, Aslamova VS. Recycling of ashy waste products. *Ekologiya i promyshlennost Rossii = Ecology and Industry of Russia*. 2010;1:39–41. (In Russian)

11. Redinova AV, Ignatova ON, Grabelnykh VA, Levanova EP, Russavskaya NV, Terek SV, et al. *Method for producing sulfur sorbents for wastewater treatment of heavy metals*. Patent RF, no. 2475299; 2013. (In Russian)

12. Redinova AV, Grabelnykh VA, Levanova EP, Korchevin NA. Extraction of heavy metal ions from water solutions by sulfur-containing polymer sorbents. *Vestnik Irkutskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Proceedings of Irkutsk State Technical University*. 2013;1:113–116. (In Russian)

13. Chernysheva EA, Grabelnykh VA, Levanova EP, Russavskaya NV, Rozencvejg IB, Korchevin NA.

New Approach to the Realisation of Adsorption Properties of Lignin: Preparation of Sulphur-Containing Sorbents for Heavy Metal Ions. *Khimiya v interesah ustoichivogo razvitiya = Chemistry for Sustainable Development*. 2017;25(3):327–332. (In Russian) <https://doi.org/10.15372/KhUR20170312>

14. Chernysheva EA, Grabelnykh VA, Levanova EP, Ignatova ON, Rozentsvejg IB, Russavskaya NV, et al. *Method of producing sorbent for removing heavy metals from waste water*. Patent RF, no. 2558896. (In Russian)

15. Chelishchev NF, Berenshtein BG, Volodin VF. *Zeolites are a new type of mineral raw materials*. Moscow: Nedra; 1987. 82 p. (In Russian)

16. Deryagina EN, Levanova EP, Grabelnykh VA, Sukhomazova EN, Russavskaya NV, Korchevin NA. Thiylation of polyelectrophiles with sulfur in hydrazine – hydrate – amine systems. *Russian Journal of General Chemistry*. 2005;75(2):194–199. <https://doi.org/10.1007/s11176-005-0197-y>

17. Obuzdina MV, Rush EA, Dneprovskaya AV, Shalunts LV, Ignatova ON, Levanova EP, et al. *Method of obtaining a sorbent to extract heavy metals from wastewater*. Patent RF, no. 2624319; 2016. (In Russian)

18. Aslamova VS, Shalunc LV, Obuzdina MV, Grabelnykh VA. Modelling the process of adsorption in the liquid-solid system: Regression analysis of copper extraction from aqueous solutions by zeolite from the Kholinskoye deposit modified by a sulphur-containing polymer. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(2):351–359. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-351-359>

19. Karnaukhov AP. *Adsorption. Texture of dispersed and porous materials*. Novosibirsk: Nauka; 1999. 470 p. (In Russian)

20. Marchenko Z. *Photometric determination of elements*. Moscow: Mir; 1971. 376 p.

21. Aslamova VS, Shalunc LV, Obuzdina MV, Rush EA. Regression models for the extraction of nickel ions from aqueous solutions by modified zeolite. In: *Matematicheskie metody v tekhnike i tekhnologiyah: sbornik trudov XXXI mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii = Mathematical methods in engineering and technology: Proceedings of XXXI International Scientific Conference*. 10–14 Septem-

ber, 2018. St. Petersburg: Polytechnical University; 2018, vol. 10, p. 37–40. (In Russian)

22. Aslamova VS, Shalunc LV, Grabel'nykh VA, Aslamov AA. Regression models of zinc ion adsorption from aqueous solutions on zeolite from Kholinski deposit, modified with a sulphur-containing polymer. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(1):29–38. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-1-29-38>

23. Aslamova VS, Chernysheva EA, Grabel'nykh VA, Levanova EP, Russavskaya NV. Regression analysis of the regularities of extraction of zinc

and cadmium ions from aqueous solutions with a sulfur-based sorbent based on lignin. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018;8(4):174–183. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-4-174-183>

24. Mamonova MV, Prudnikov VV, Prudnikova IA. *Surface physics. Theoretical models and experimental methods*. Moscow: Fizmatlit; 2011. 400 p. (In Russian)

25. Kukushkin VYu, Kukushkin YuN. *Theory and practice of synthesis of coordination compounds*. Leningrad: Nauka; 1990. 259 p. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Асламова Вера Сергеевна,

д.т.н., профессор,
Иркутский государственный университет
путей сообщения,
664074, г. Иркутск, ул. Чернышевского, 15,
Российская Федерация,
✉ e-mail: aslamovav@yandex.ru

Шалуц Лиана Валерьевна,

соискатель,
Центр охраны окружающей среды ВСЖД –
филиал ОАО «РЖД»,
664033, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 7,
Российская Федерация,
e-mail: liana_shalunc@list.ru

Асламов Александр Анатольевич,

к.т.н., доцент,
Ангарский государственный технический
университет,
665835, г. Ангарск, ул. Чайковского, 60,
Российская Федерация,
e-mail: aaa_mx@angtu.ru

Грабельных Валентина Александровна,

к.х.н., научный сотрудник,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
e-mail: venk@irioch.irk.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Статья поступила в редакцию 07.07.2020;
одобрена после рецензирования 21.09.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Vera S. Aslamova,

Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Irkutsk State Transport University,
15, Chernyshevsky St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ e-mail: aslamovav@yandex.ru

Liana V. Shalunc,

Applicant,
Center of environmental protection
of East Siberian railway – branch of JSC "RRW",
7, Karl Marx St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: liana_shalunc@list.ru

Alexander A. Aslamov,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Angarsk State Technical University,
60, Tchaikovsky St., Angarsk, 665835,
Russian Federation,
e-mail: aaa_mx@angtu.ru

Valentina A. Grabel'nykh,

Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: venk@irioch.irk.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regard-
ing the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 07.07.2020;
approved after reviewing 21.09.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 547.298+543.257.1

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-573-580>



Кисотно-основные свойства производных имидазо[2,1-*b*]тиазолов и тиазоло[3,2-*a*]бензимидазолов

© А.С. Плотникова*, Г.Б. Недвецкая*, Ю.А. Айзина^{***,***},
В.Ю. Серых^{***}

*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация

**Иркутский национальный исследовательский технический университет,
г. Иркутск, Российская Федерация

***Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: Азотметиновая группа привлекает внимание ученых уже на протяжении 30 лет. Повышенный интерес обусловлен ее высокой электрофильностью, которая формируется под влиянием сильных электроакцепторных заместителей. Сочетание полигалогеналкильной группы и функциональных заместителей в непосредственной близости к азотметиновой связи открывает широкий спектр возможных химических превращений, одним из которых является получение гетероциклических производных. Так как гетероциклические соединения интересны ученым с синтетической стороны, и существуют примеры их использования в медицине, то не менее актуальной задачей является изучение NH-кислотности этих соединений. На основании данных о кислотно-основных свойствах соединений можно предвидеть их некоторые физико-химические свойства, реакционную способность. Потенциометрическим методом определены константы диссоциации исследуемых веществ. В результате получены кривые титрования с разным количеством ступеней диссоциации (их количество определяется числом NH-групп) с четко выраженным скачком потенциала индикаторного электрода. Экспериментальное определение кислотно-основного поведения синтезированных сульфониламинозамещенных имидазо[2,1-*b*]тиазолов и тиазоло[3,2-*a*]бензимидазолов проводили в среде диметилсульфоксида. Из кривых титрования определены величины потенциалов полунейтрализации. Установлена взаимосвязь значений констант кислотности (pK_A) с величинами потенциалов полунейтрализации. Зависимость $pK_A = f(E^{1/2})$ позволяет прогнозировать константы NH-кислотности в среде диметилсульфоксида для новых синтезированных соединений. Определены статистические границы расхождения результатов потенциометрического измерения. Проведена процедура проверки внутрилабораторной прецизионности. Установлено, что полученные значения констант диссоциации характеризуются высокой внутрилабораторной прецизионностью. Коэффициенты вариации изменяются в пределах от 0,34 до 1,48%. С помощью компьютерной программы PASS осуществлен расчет потенциала биологической активности (P_a) исследуемых соединений. Зависимость между NH-кислотностью с биологическим потенциалом соединений неоднозначна.

Ключевые слова: аннелированные имидазолы, NH-кислотность, константы диссоциации, потенциометрическое титрование, потенциал полунейтрализации, программа PASS

Для цитирования: Плотникова А.С., Недвецкая Г.Б., Айзина Ю.А., Серых В.Ю. Кислотно-основные свойства производных имидазо[2,1-*b*]тиазолов и тиазоло[3,2-*a*]бензимидазолов. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 4. С. 573–580. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-573-580>

Acid-base properties of imidazo[2,1-*b*]thiazole and thiazolo[3,2-*a*]benzimidazole derivatives

Anastasiya S. Plotnikova*, Galina B. Nedvetskaya*, Yuliya A. Aizina^{***,***},
Valery Yu. Serykh^{***}

*Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

**Irkutsk National Research Technical University,
Irkutsk, Russian Federation

***A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: For over 30 years, azomethine groups have been attracting significant research interest due to their high electrophilicity formed under the influence of strong electrophilic substituents. The combination of a polyhalidealkyl group and functional substituents in close proximity to the azomethine bond reveals a wide range of possible chemical transformations, one of which is the production of heterocyclic derivatives. Since heterocyclic compounds are of interest in terms of their medical and synthetic prospects, research into the NH-acidity of these compounds is highly relevant. Information on the acid-base properties of such compounds is useful for predicting their reactivity and physical-chemical properties. The potentiometric titration method was used to determine the dissociation constants of the substances under study. As a result, titration curves with a different number of dissociation stages (their number was determined by the number of NH-groups) were obtained, which showed a clear jump in the potential of the indicating electrode. The experimental determination of the acid-base behaviour of the synthesized sulphonylamine-substituted imidazo[2,1-b]thiazoles and thiazolo[3,2-a]benzimidazoles was carried out in dimethylsulphoxide medium. The semi-neutralization potentials were determined using titration curves. A relationship between acidity constants (pK_A) and semi-neutralization potentials was determined. The $pK_A = f(E^{1/2})$ dependence allows the constants of NH-acidity for newly synthesized compounds in dimethylsulphoxide medium to be predicted. The statistical range of the conducted potentiometric titration was determined. The obtained dissociation constants showed a high level of intermediate precision. The variation coefficients ranged from 0.34 to 1.48%. The PASS software was used to calculate the potential of biological activity (Pa) of the compounds under study. The relationship between NH-acidity and biological potential is still ambiguous.

Keywords: annulated imidazoles, NH-acidity, dissociation constants, potentiometric titration, semi-neutralization potential, PASS software

For citation: Plotnikova AS, Nedvetskaya GB, Aizin YuA, Serykh VYu. Acid-base properties of imidazo[2,1-b]thiazole and thiazolo[3,2-a]benzimidazole derivatives. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):573–580. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-573-580>

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что производные аннелированных гетероциклических соединений, в состав которых в качестве структурного компонента входит имидазо[2,1-*b*]тиазол, обладают широким спектром биологической активности [1]. Перспективы применения биологически активных имидазо-тиазолов связаны с их способностью ингибировать или активировать различные ферменты и рецепторы [2]. Эти соединения проявляют противоопухолевое [3], противомикробное [4], противо-диабетическое [5], мочегонное [6], противоглистное [7] и фунгицидное [8] свойства. Таким образом, разработка эффективных методов получения замещенных имидазо[2,1-*b*]тиазолов, а также синтез новых представителей гетероциклических систем напрямую связаны с возможностью создания лекарственных препаратов [9–14], что является актуальной задачей. Не менее важным является изучение NH-кислотности этих соединений, поскольку на основании данных о кислотно-основных свойствах соединений можно предвидеть некоторые их физико-химические свойства и реакционную способность.

Целью настоящей работы являлось изучение NH-кислотности сульфониламинозамещенных аннелированных производных имидазола и оценка их биологической активности потенциометрическим методом, а также с помощью программного обеспечения PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances). PASS-прогнозирование осуществляется по структурной форму-

ле вещества, поэтому может быть выполнено уже на стадии планирования синтеза

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Взаимодействие 4-хлор-N-[2,2-дихлор-2-фенилэтилиден]бензолсульфонамида (I) с 2-меркаптобензимидазолом (IIa) и 2-меркапто-4-фенилбензимидазолом (IIb) (рис. 1) осуществлено в соответствии с методом, описанным в работе [11].

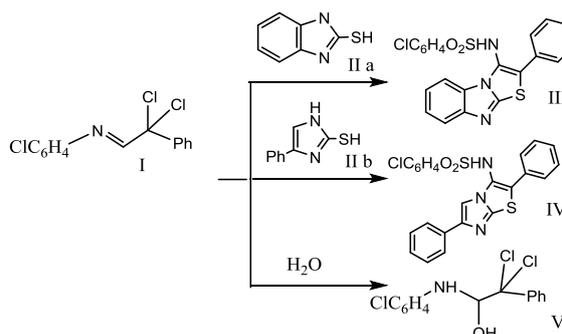


Рис. 1. Взаимодействие 4-хлор-N-[2,2-дихлор-2-фенилэтилиден]бензолсульфонамида с водой, 2-меркаптобензимидазолом и 2-меркапто-4-фенилбензимидазолом

Fig. 1. Interaction of 4-chloro-N-[2,2-dichloro-2-phenylethylidene] benzenesulfonamide with water, 2-mercaptobenzimidazole and 2-mercapto-4-phenylbenzimidazole

Для полученных соединений потенциометрическим методом на pH-метре-ионере Эксперт-001 в среде диметилсульфоксида

(ДМСО) определены константы диссоциации pK_A (NH-кислотность). При титровании производных имидазо[2,1-b]тиазола получены кривые с разным количеством ступеней диссоциации на кривых титрования (рис. 2). В случае соединений III и IV имелось два скачка на кривой титрования. При титровании соединения IV с использованием более разбавленного титранта – раствора KOH в метаноле (IV*) наблюдается три скачка титрования¹ [15–18].

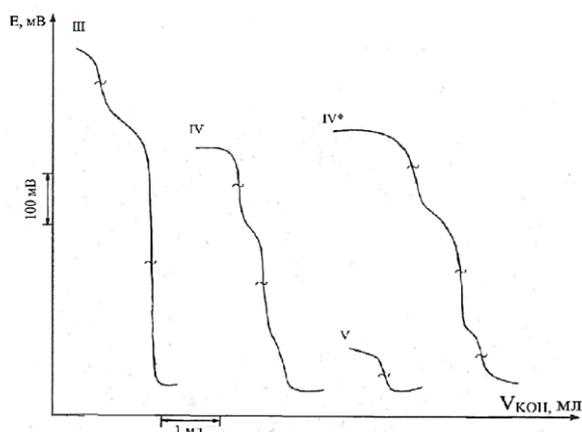


Рис. 2. Кривые потенциометрического титрования соединений III–V в среде диметилсульфоксида

Fig. 2. Potentiometric titration curves of compounds III – V in dimethyl sulfoxide medium

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Значения констант диссоциации (NH-кислотность) соединений в среде ДМСО представлены в табл. 1. При числе повторений $n = 3$ расчетная погрешность $p = 0,95$, критерий Стьюдента, t , составил 4,30.

Анализируя строение соединений и вид полученных кривых титрования, можно предположить, что третий скачек на кривой принадлежит

примеси, которая может получаться в результате гидратации исходного имина (I) с образованием соединения, содержащего гидроксильную группу (V) (см. табл. 1). При титровании соединения V выявлен скачек полунейтрализации (потенциал – 327 мВ), близкий к аналогичным величинам $E^{1/2}$ на кривых титрования синтезированных соединений, на основании чего третий скачек на кривых титрования соединения IV* можно отнести к диссоциации гидроксигруппы с pK_A , равной 12,83–12,93 ед.

Известно, что атом азота в имидазольном кольце может протонироваться, проявляя при этом сильнокислотные свойства, выступая в роли заряженной кислоты. Поэтому первый скачек на кривых титрования принадлежит, на наш взгляд, протонированному азоту с константой диссоциации, равной 5–6 ед. pK (см. табл. 1).

Второй скачек диссоциации на кривых титрования принадлежит титрованию фрагмента $-SO_2NH-$. Величины констант изменяются в диапазоне от 7,56 до 8,74 ед. pK , то есть исследуемые соединения проявляют достаточно сильные кислотные свойства.

Полученные значения констант диссоциации характеризуются высокой внутрилабораторной прецизионностью. Коэффициенты вариации изменяются в пределах 0,34–1,48%.

В табл. 2 представлены статистически обработанные результаты определения константы диссоциации соединения III.

Установлена зависимость $pK_A = f(E^{1/2})$, которая позволяет прогнозировать константы NH-кислотности в среде ДМСО для вновь синтезированных соединений (рис. 2).

В табл. 3 сведены данные статистической обработки потенциометрического анализа индивидуальных соединений, $n = 3$, $p = 0,95$, $t = 4,30$.

Таблица 1. Константы диссоциации (pK_A) соединений в среде диметилсульфоксида
 Table 1. Dissociation constants (pK_A) of compounds in a DMSO

Соединение	$E^{1/2}$, мВ	ΔE , мВ	$pK_A \pm \Delta pK$	V, %
III	I – 122	87	$5,03 \pm 0,04$	0,34
	II – 10	432	$7,38 \pm 0,19$	1,02
IV / IV*	Титрант ДМСО			
	I – 69	121	$5,99 \pm 0,22$	1,48
	II – 85	172	$8,61 \pm 0,28$	1,30
	Титрант 0,05N KOH в метаноле			
	I – 70	117	$5,98 \pm 0,17$	1,16
	II – 92	179	$8,74 \pm 0,18$	0,81
III – 34	73	$12,83 \pm 0,23$	0,71	
V	327	70	$12,87 \pm 0,13$	0,39

¹Фиалков Ю.Я., Житомирский А.Н., Тарасенко Ю.А. Физическая химия неводных растворов. Л.: Химия, 1973. 376 с.

Таблица 2. Расчет критерия Стьюдента для соединения III
Table 2. Calculation of Student's test for compound III

X_i (рK _A)	\bar{X}	S	t	$\bar{X} \pm \Delta X$	V, %
7,47	7,38	0,075	4,30	7,38±0,19	1,02
7,34					
7,34					

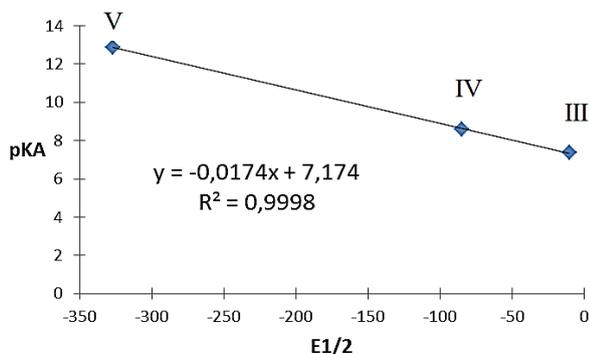


Рис. 2. Зависимость рK_A гетероциклов от потенциалов полунейтрализации в среде диметилсульфоксида

Fig. 2. Dependence of рK_A heterocycles on the potentials of semi-neutralization in DMSO medium

Как видно из табл. 3, данные соединения характеризуются относительно высокой внутрилабораторной прецизионностью, коэффициент ва-

риации находится в пределах от 2,0 до 10,3%. Оценка правильности проведена методом «введено–найдено» [16]. Установлено, что значимые систематические погрешности в результатах анализа могут быть обусловлены недостаточной аналитической чистотой соединения.

Для исследуемых гетероциклических структур был выполнен прогноз биологической активности с помощью компьютерной программы PASS, являющейся удобным инструментом для быстрого получения спектра биологической активности для различных классов соединений.

При PASS-прогнозировании результаты выдаются пользователю в виде списка названий вероятных видов активности с расчетными оценками вероятностей наличия Pa (probability to be active) и отсутствия Pi (probability to be inactive) каждого вида активности, которые имеют значения от 0 до 1. Для случаев, когда Pa >> Pi, от соединения следует ожидать проявления биологической активности. Наибольший интерес представляют структуры, для которых Pa > 0,7 (70%) при Pi < 0,1 (10%), поскольку именно таким показателям удовлетворяют известные биологически активные вещества.

В табл. 4 представлены максимальные значения Pa для соединений III–V.

Таблица 3. Сводная таблица статистической обработки результатов*
Table 3. Summary table of result statistical processing

Соединение	m навески (введено), г	Объем в т.э., мл	m (найдено), г	$m_{cp.} \pm \Delta \delta$	V, %
III	0,0440	0,81	0,0356	0,0374±0,0095	10,26
		0,95	0,0418		
		0,79	0,0348		
IV	0,0516	0,62	0,0273	0,0261±0,0027	4,24
		0,59	0,0260		
		0,57	0,0251		
V	0,0381	0,87	0,0364	0,0361±0,0032	3,54
		0,83	0,0347		
		0,89	0,0361		
IV*	0,0516	1,20	0,0264	0,0263±0,0017	2,56
		1,16	0,0255		
		1,22	0,0268		

Примечание. Для соединения IV* титрант – 0,05N KOH в метаноле.

Таблица 4. Оценка биологической активности с помощью PASS-прогнозирования
Table 4. Biological activity assessment using PASS

Соединение	Виды биологической активности, Pa				
	III	Инсулилин ингибитор (0,644)	Субстрат CYP2C10 (0,562)	Фталат 4,5-диоксигеназы ингибитор (0,587)	Антагонист Mcl-1 (0,523)
IV	Фосфолипид-транслоцирующий ингибитор АТ фазы (0,452)	Эндопептидаза So ингибитор (0,419)	Субстрат CYP2C9 (0,389)	Антагонист Mcl-1 (0,316)	Антипротозойный (Coccidial) (0,202)
V	Субстрат CYP2J (0,613)	K ингибитор (0,577)	L-глутамат оксидазы ингибитор (0,591)	Миозин АТ фазы ингибитор (0,572)	Ингибитор эластазы поджелудочной железы (0,569)

Из полученных данных можно сделать следующее заключение: несмотря на схожесть гетероциклических структур и близость их потенциалов кислотности, исследуемые соединения обладают абсолютно разным потенциалом биологической активности. Наличие одинаковых фрагментов в структурах не позволяет предвидеть определенный вид активности, наблюдаемый у аналогов, и, соответственно, невозможно установить зависимость потенциальной биологической активности от их кислотного потенциала, как это сделано авторами статьи [19]. Возможно, это связано со сложностью изучаемых гетероциклических структур. Также следует отметить, что показатель биологической активности P_a изученных соединений не достигает 70%. Авторами статьи [20] показано, что наличие атомов хлора в структуре исследуемых соединений приводит к увеличению показателя P_a . Однако со-

гласно данным, представленным в табл. 4, даже присутствие трех атомов хлора в соединении **V** не увеличивает этот расчетный потенциал до 70%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано кислотно-основное поведение синтезированных сульфониламино-замещенных имидазо[2,1-*b*]тиазолов и тиазоло[3,2-*a*]бензимидазолов. Кривые титрования имеют несколько выраженных скачков потенциала индикаторного электрода. Количество скачков соответствует количеству аминогрупп в соединении. Показано влияние аналитической чистоты соединения на определение систематической погрешности. Проведено компьютерное прогнозирование (PASS) биологической активности. Зависимость между NH-кислотностью и биологическим потенциалом соединений не установлена.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Hanson S.M., Morlock E.V., Satyshur K.A., Czajkowski C. Structural requirements for eszopiclone and zolpidem binding to the γ -aminobutyric acid type-A (GABA_A) receptor are different // Journal of Medicinal Chemistry. 2008. Vol. 51. Issue 22. P. 7243–7252. <https://doi.org/10.1021/jm800889m>
2. Chen Y., Lan Y., Cao X., Xu X., Zhang J., Yu M., et al. Synthesis and evaluation of amide, sulfonamide and urea – benzisoxazole derivatives as potential atypical antipsychotics // Medicinal Chemistry Communication. 2015. Vol. 6. Issue 5. P. 831–838. <https://doi.org/10.1039/C4MD00578C>
3. Margiotta N., Ostuni R., Rinaldo R., Denora N., Laquintana V., Trapani G., et al. Synthesis and characterization of a platinum(II) complex tethered to a ligand of the peripheral benzodiazepine receptor // Journal of Medicinal Chemistry. 2007. Vol. 50. Issue 5. P. 1019–1027. <https://doi.org/10.1021/jm0612160>
4. Bechmann N., Kniess T., Koeckerling M., Pignorsch A., Steinbach J., Pietzsch J. Novel (pyrazolyl)benzenesulfonamides with a nitric oxidereleasing moiety as selective cyclooxygenase – 2 inhibitors // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2015. Vol. 25. Issue 16. P. 3295–3300. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.05.059>
5. Aginagalde M., Vara Y., Arrieta A., Zangi R., Cebolla V.L., Delgado-Camon A., et al. Tandem [8+2]-cycloaddition-[2+6+2] dehydrogenation reactions involving imidazo[1,2-*a*]pyridines and imidazo[1,2-*a*]pyrimidines // The Journal of Organic Chemistry. 2010. Vol. 75. Issue 9. P. 2776–2784. <https://doi.org/10.1021/jo9022815>
6. Hoffmann M., Plutecka A., Rychlewska U., Kucybała Z., Paczkowski J., Pyszka I. New type of bonding formed from an overlap between π aromatic and π^* CO molecular orbitals stabilizes the coexistence in one molecule of the ionic and neutral meso-ionic forms of imidazopyridine // The Journal of Physical Chemistry A. 2005. Vol. 109. Issue 20. P. 4568–4574. <https://doi.org/10.1021/jp0447892>
7. Айзина Ю.А., Никитин А.Я., Левковская Г.Г. Расчетная методом PASS и экспериментальная оценка биологической активности сульфонамидо-полихлор-этилированных аренов и гетаренов. // Вестник ИрГТУ, 2014. N 12 (95), С. 188-191.
8. Firke S.D., Bari S.B. Synthesis, biological evaluation and docking study of maleinide derivatives bearing benzenesulfonamide as selective COX- 2 inhibitors and anti – inflammatory agents // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2015. Vol. 23. Issue 17. P. 5273–5281. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.070>
9. Aizina Yu.A., Rozentsveig I.B., Levkovskaya G.G., Mirskova A.N. Synthesis and properties of *n*-(2,2,2-trichloroethyl)-2- thiophenesulfonamides // Russian Journal of Organic Chemistry. 2003. Vol. 39. Issue 9. P. 1334–1337. <https://doi.org/10.1023/B:RUJO.0000010224.50448.f5>
10. Rozentsveig I.B., Serykh V.Y., Chernysheva G.N., Chernyshev K.A., Kondrashov E.V., Tretyakov E.V., et al. One-pot synthesis of *N*-(imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-yl)- and *N*-(imidazo[2,1-*b*][1,3]thiazol-5-yl)sulfonamides // European Journal of Organic Chemistry. 2013. Issue 2. P. 368–375. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201201006>
11. Serykh V.Y., Kaliev A.R., Ushakov I.A., Borodina T.N., Smirnov V.I., Rozentsveig I.B. Regioselective reaction of imidazole-2-thiols with *N*-sulfonylphenyl-dichloroacetaldimines: en route to novel sulfonylamino-substituted imidazo[2,1-*b*]thiazoles and thiazolo[3,2-*a*]benzimidazoles // Arkivoc. 2018. Part 3. P. 62–75. <https://doi.org/10.24820/ark.5550.190.p010.357>
12. Chen Y. Recent functionalizations of primary sulfonamides // Synthesis. 2016. Vol. 48. Issue 16. P. 2483–2522. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1562503>
13. Aizina Yu.A., Levkovskaya G.G., Ro-

zentsveig I.B. New synthetic approach to phenylmethanesulfonamide derivatives on the basis of phenyl-n-(2,2,2-trichloroethylidene)-methanesulfonamide // Russian Journal of Organic Chemistry. 2012. Vol. 48. Issue 4. P. 477–480. <https://doi.org/10.1134/S107042801204001X>

14. Aizina Yu.A., Rozentsveig I.B., Levkovskaya G.G. A novel synthesis of chloroacetamide derivatives via C-amidoalkylation of aromatics by 2-chloro-N-(2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl)acetamide // Arkivoc. 2011. Issue 8. P. 192–199. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.815>

15. Клоос О.В., Недвецкая Г.Б., Айзина Ю.А., Розейнцвейг И.Б. Сульфонамиды и их кислотные свойства в диметилсульфоксиде // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2016. Т. 6. N 2 (17) С. 23–29. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-2-23-29>

16. Крешков А.П., Алдарова Н.Ш., Танга-

нов Б.Б. Химико-аналитическое поведение серо-содержащих алифатических дикарбоновых кислот в среде неводных растворителей // Журнал аналитической химии. 1970. Т. 25. N 2. С. 362–368.

17. Фиалков Ю.Я. Не только в воде. 2-е изд., перераб. и доп. Л.: Химия, 1989. 88 с.

18. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ; 2-е изд., перераб. и доп. Волгоград: Семь ветров, 1999. 640 с.

19. Айзина Ю.А. Использование современных информационных технологий для выявления биологической активности органических соединений. // Вестник ИрГТУ, 2012. N 4 (63). С. 145–149.

20. Айзина Ю.А. Синтетический поиск потенциально биологически активных продуктов из 2-метилбензолсульфонамида // Вестник ИрГТУ, 2013. N 8 (79), С. 138–143.

REFERENCES

1. Hanson SM, Morlock EV, Satyshur KA, Czajkowski C. Structural requirements for eszopiclone and zolpidem binding to the γ -aminobutyric acid type-A (GABA_A) receptor are different. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;51(22):7243–7252. <https://doi.org/10.1021/jm800889m>

2. Chen Y, Lan Y, Cao X, Xu X, Zhang J, Yu M, et al. Synthesis and evaluation of amide, sulfonamide and urea – benzisoxazole derivatives as potential atypical antipsychotics. *Medicinal Chemistry Communication*. 2015;6(5):831–838. <https://doi.org/10.1039/C4MD00578C>

3. Margiotta N, Ostuni R, Ranaldo R, Denora N, Laquintana V, Trapani G, et al. Synthesis and characterization of a platinum(II) complex tethered to a ligand of the peripheral benzodiazepine receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007;50(5):1019–1027. <https://doi.org/10.1021/jm0612160>

4. Bechmann N, Kniess T, Koeckerling M, Pigorsch A, Steinbach J, Pietzsch J. Novel (pyrazoly)benzenesulfonamides with a nitric oxidereleasing moiety as selective cyclooxygenase – 2 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015;25(16):3295–3300. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.05.059>

5. Aginagalde M, Vara Y, Arrieta A, Zangi R, Cebolla VL, Delgado-Camon A, et al. Tandem [8+2]-cycloaddition-[2+6+2] dehydrogenation reactions involving imidazo[1,2-a]pyridines and imidazo[1,2-a]pyrimidines. *The Journal of Organic Chemistry*. 2010;75(9):2776–2784. <https://doi.org/10.1021/jo9022815>

6. Hoffmann M, Plutecka A, Rychlewska U, Kucybala Z, Paczkowski J, Pyszka I. New type of bonding formed from an overlap between π aromatic and π^* CO molecular orbitals stabilizes the coexistence in one molecule of the ionic and neutral meso-ionic forms of imidazopyridine. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2005;109(20):4568–4574.

<https://doi.org/10.1021/jp0447892>

7. Aizina YuA, Nikitin AYA, Levkovskaya GG. PASS method calculated and experimental assessment of biological activity of sulfonamide polychlorinated ethylated arenes and hetarenes. *Vestnik Irkutskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Proceedings of Irkutsk State Technical University*. 2014;12:188–191. (In Russian)

8. Firke SD, Bari SB. Synthesis, biological evaluation and docking study of maleinide derivatives bearing benzenesulfonamide as selective COX- 2 inhibitors and anti – inflammatory agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2015;23(17):5273–5281. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.070>

9. Aizina YuA, Rozentsveig IB, Levkovskaya GG, Mirskova AN. Synthesis and properties of n-(2,2,2-trichloroethyl)-2-thiophenesulfonamides. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2003;39(9):1334–1337. <https://doi.org/10.1023/B:RUJO.0000010224.50448.f5>

10. Rozentsveig IB, Serykh VY, Chernysheva GN, Chernyshev KA, Kondrashov EV, Tretyakov EV, et al. One-pot synthesis of N-(imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)- and N-(imidazo[2,1-b][1,3]thiazol-5-yl)sulfonamides. *European Journal of Organic Chemistry*. 2013;2:368–375. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201201006>

11. Serykh VY, Kaliev AR, Ushakov IA, Borodina TN, Smirnov VI, Rozentsveig IB. Regioselective reaction of imidazole-2-thiols with N-sulfonylphenyldichloroacetaldimines: en route to novel sulfonylamino-substituted imidazo[2,1-b]thiazoles and thiazolo[3,2-a]benzimidazoles. *Arkivoc*. 2018(3):62–75. <https://doi.org/10.24820/ark.5550190.p010.357>

12. Chen Y. Recent functionalizations of primary sulfonamides. *Synthesis*. 2016;48(16):2483–2522. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1562503>

13. Aizina YuA, Levkovskaya GG, Rozentsveig IB. New synthetic approach to phenylmethanesulfonamide derivatives on the basis of phenyl-n-(2,2,2-tri-

chloroethylidene)-methanesulfonamide. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2012;48(4):477–480. <https://doi.org/10.1134/S107042801204001X>

14. Aizina YuA, Rozentsveig IB, Levkovskaya GG. A novel synthesis of chloroacetamide derivatives via C-amidoalkylation of aromatics by 2-chloro-N-(2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl)acetamide. *Arkhivoc*. 2011;8:192–199. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.815>

15. Kloos OV, Nedvedskaya GB, Aizina YuA, Rozentsveig IB. Sulfonamides and their acidic properties in dimethylsulfoxide. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2016;6(2):23–29. (in Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-2-23-29>

16. Kreshkov AP, Aldarova NSh, Tanganov BB. Chemico-analytical behavior of sulphur-containing aliphatic dicarboxylic acids in a medium of non-aqueous solvents. *Zhurnal analiticheskoi khimii =*

Journal of Analytical Chemistry. 1970;25(2):362–368. (In Russian)

17. Fialkov YuYa. *Not only in the water*. Leningrad: Chemistry; 1989. 88 p. (In Russian)

18. Sergeev PV, Shimanovskii NL, Petrov VI. *Receptors of physiologically active substances*. Volgograd: Sem' vetrov; 1999. 640 p. (In Russian)

19. Aizina YuA. Use of modern information technologies for revealing biological potency of organic compounds. *Vestnik Irkutskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Proceedings of Irkutsk State Technical University*. 2012; 4:145–149. (In Russian)

20. Aizina YuA. Synthetic search for potentially bioactive products from 2-methyl-benzenesulfonamide. *Vestnik Irkutskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Proceedings of Irkutsk State Technical University*. 2013;8:138–143. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Плотникова Анастасия Сергеевна,
магистрант,
Иркутский государственный университет,
664033, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: nastyusha.plotnikova@inbox.ru

Недвецкая Галина Борисовна,
к.х.н., доцент,
Иркутский государственный университет,
664033, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: galinedvetskaya@gmail.com

Айзина Юлия Александровна,
к.х.н., доцент,
Иркутский государственный технический
университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: aizina@ex.istu.edu;
научный сотрудник,
Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского
СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: aizina_yulia@irioch.irk.ru

Серых Валерий Юрьевич,
к.х.н., научный сотрудник
Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского
СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
e-mail: serykhvu@irioch.irk.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anastasiya S. Plotnikova,
Master Student,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: nastyusha.plotnikova@inbox.ru

Galina B. Nedvedskaya,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: galinedvetskaya@gmail.com

Yuliya A. Aizina,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
National Research Irkutsk State Technical
University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: aizina@ex.estu.edu;
Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry
SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ e-mail: aizina_yulia@irioch.irk.ru

Valery Yu. Serykh
Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry
SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: serykhvu@irioch.irk.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

*Статья поступила в редакцию 03.02.2020;
одобрена после рецензирования 16.09.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

*The article was submitted 03.02.2020;
approved after reviewing 16.09.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 664.11+577.1+547.9

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-581-589>



Термодеструкция продукта конденсации D-маннозы с *p*-аминоацетанилидом в системах без растворителя

© И.С. Черепанов

Удмуртский государственный университет, г. Ижевск, Российская Федерация

Резюме: Методами электронной и колебательной спектроскопии изучена термодеструкция продукта конденсации D-маннозы с *p*-аминоацетанилидом в системах без растворителя, в частности, вазелиновом масле и KBr-матрице. Термодеструкция маннозиламина в KBr-матрице сопровождается интенсивным окрашиванием, при этом полосы в ИК-спектрах, характеризующие функционализацию аминоацетанилида сохраняют свое положение и интенсивность, что свидетельствует об отсутствии трансформации аминного фрагмента. Отмечается появление полос еноновых O=C-C=C-фрагментов 1645, 1680, 1690 см⁻¹, а также 1750, 1780 см⁻¹, относимых к валентным C=O колебаниям сложных эфиров и лактонов, образующихся, вероятно, в результате трансформации первичных продуктов распада маннозиламина. Термодеструкция суспензии маннозиламина в вазелиновом масле показывает меньшую в сравнении с процессами в KBr-матрице степень трансформации структуры маннозиламина в условиях эксперимента. В спектрах регистрируются полосы колебаний C=O в различном структурном окружении, а также характеризующее элиминирование ариламина смещение сигнала 1280 см⁻¹ в низкочастотную область. Спектры отражения спиртовых растворов продуктов деструкции показывают наличие только полосы 1750 см⁻¹, тогда как частота 1780 см⁻¹ не проявляется, вероятно, по причине лабильности лактонов в растворах, обуславливающей их рециклизацию. Анализ колебательных спектров показывает отсутствие характерных для меланоидиновых N-гетероциклов полос вследствие преимущественного образования ациклических сопряженных систем и производных карбоновых кислот в исследованных системах без растворителя. В электронных спектрах спиртовых растворов продуктов деструкции обеих систем регистрируются максимумы около 260 нм, отвечающие поглощению оксиеноновых хромофоров и области непрерывного поглощения в видимой части спектра, обусловленные образованием протяженных хромофоров – продуктов конденсации интермедиатов распада маннозиламина. Полученные результаты могут быть полезны как при выборе условий получения продуктов реакции Майяра с заданной функционализацией, так и при разработке методов синтеза антиокислительных агентов для защиты от окисления полимеров и масел.

Ключевые слова: D-манноза, *p*-аминоацетанилид, лактоны, меланоидины, термодеструкция, спектроскопия

Для цитирования: Черепанов И.С. Термодеструкция продукта конденсации D-маннозы с *p*-аминоацетанилидом в системах без растворителя. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 4. С. 581–589. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-581-589>

Thermal destruction of D-mannose condensation products using *p*-aminoacetanilide in solvent-free systems

© Igor S. Cherepanov

Udmurt State University, Izhevsk, Russian Federation

Abstract: Thermal destruction of D-mannose condensation products using *p*-aminoacetanilide in solvent-free systems, such as paraffinic oil and a KBr-matrix, was studied by the methods of electronic and vibrational spectroscopy. The thermal destruction of mannosylamine in a KBr matrix is accompanied by intense coloration. At the same time, the bands in the IR spectra characterizing the functionalization of aminoacetanilide retain their position and intensity, which indicates the absence of transformation of the amine fragment. The appearance of the 1645, 1680, 1690 cm⁻¹ bands of enone O=C-C=C- fragments is noted, along with the 1750 and 1780 cm⁻¹ bands attributed to the stretching C=O vibrations of esters and lactones likely formed as a result of transformation of the primary mannosylamine degradation products. The thermal destruction of a mannosylamine suspension in paraffinic oil shows a lower transformation of the mannosylamine structure in comparison with experimental processes in a KBr matrix. The spectra depict the bands of C=O vibrations in different structural environments, as well as the signal shift of 1280 cm⁻¹ into the low-

frequency region characterizing the elimination of arylamine. The reflection spectra of the alcohol solutions of destruction products demonstrate the presence of only the 1750 cm^{-1} band; the 1780 cm^{-1} band does not appear probably due to the instability of lactones in solutions, which causes their recyclization. An analysis of vibrational spectra showed the absence of bands characteristic of melanoidin *N*-heterocycles due to the predominant formation of acyclic conjugated systems and carboxylic acid derivatives in the studied solvent-free systems. In the electronic spectra of the alcohol solutions of destruction products in both systems, maxima of about 260 nm were recorded. These maxima correspond to the absorption of oxygenone chromophores and the continuous absorption region in the visible part of the spectrum, caused by the formation of extended chromophores, i.e. condensation products of the intermediates of mannosylamine decomposition. The obtained results can be useful both when selecting conditions for the Maillard reaction with a given functionalization and when developing methods for the synthesis of antioxidant agents for protecting polymers and oils.

Keywords: *D*-mannose, *p*-aminoacetanilide, lactones, melanoidins, thermal destruction, spectroscopy

For citation: Cherepanov IS. Thermal destruction of *D*-mannose condensation products using *p*-aminoacetanilide in solvent-free systems. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):581–589. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-581-589>

ВВЕДЕНИЕ

Продукты начальных стадий реакции Майяра – *N*-гликозиламины, являются важными интермедиами биологических процессов [1–3]. Основным направлением превращений *N*-гликозиламинов является их распад, в том числе термораспад с образованием реакционноспособных интермедиагов, впоследствии формирующих структуру низко- высокомолекулярных окрашенных продуктов (меланоидинов) [4, 5]. Несмотря на сложность исследования реакции Майяра, связанную прежде всего со значительным количеством составляющих ее последовательно-параллельных процессов, проблема изучения меланоидинообразования остается актуальной. Меланоидины обладают комплексами важных свойств (антиоксидантные, антимикробные, антикоагулянтные), определяющимися структурно-групповым составом, который в свою очередь зависит от условий проведения реакций [2, 3].

В отличие от производных алифатических аминов ариламиноконъюгаты и их поведение в природных и искусственных системах изучено в меньшей степени [4]. Ранее нами были исследованы процессы дегградации ариламиноконъюгатов в этанольных и водно-этанольных свободно-азрируемых средах [4, 5], установлено строение меланоидиновых продуктов, доказана их гетероциклическая природа. Не менее важным представляется исследование закономерностей протекания реакции Майяра в системах без растворителя [2], в том числе с ограниченным доступом кислорода, что особенно актуально для легко-окисляющихся производных арилдиаминов.

Интересными объектами исследования в практическом плане являются производные *p*-фенилендиамин, в частности *p*-аминоацетанилид [6]. Известно, что ароматические амины являются первичными антиоксидантами в процессах термоокисления полиэтилена, каучуков, масел [7], при этом ключевыми факторами применения различных антиокислительных агентов являются их ради-

калсвязывающая эффективность, токсичность, совместимость с матрицей. В процессах термодеструкции, в том числе окислительной, для молекул гликозиламинов *p*-аминоацетанилида потенциально реализуются возможности трансформации как углеводного фрагмента, так и агликона. Близкие по природе системы – антиоксиданты на основе растительного сырья, в настоящее время активно исследуются и показывают антиокислительную эффективность [8]. Конденсация *D*-глюкозы с *p*-аминоацетанилидом приводит, как было показано ранее, к образованию смеси продуктов [9], поэтому в качестве углеводного компонента была выбрана вторая по значимости и доступности моногексоза – *D*-манноза. В связи с этим целью настоящего исследования являлось изучение процессов термодеструкции продукта конденсации *D*-маннозы с *p*-аминоацетанилидом в инертных матрицах (вазелиновое масло, KBr).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез. Эквимольную смесь (0,002 моль) *D*-маннозы и *p*-аминоацетанилида (ч.д.а.) термостатировали в 15 мл этанола («Мерск») при 70 °С в течение 0,5 ч в колбе с обратным холодильником, при этом исходные реагенты полностью растворялись. Контроль за ходом реакции осуществили методом ТСХ («Silufol», элюентная система бутанол – этанол – вода в соотношении 5:2:1). По окончании процесса растворитель удаляли, твердый продукт дважды промывали безводным эфиром и высушивали в вакуум-эксикаторе. Выделенный продукт представлял собой твердое вещество серого цвета, растворимое в воде и умеренно растворимое в этаноле. Температура плавления, $T_{пл.}$, составляла 132 °С, выход продукта – 81%. Элементный анализ: найдено, %: С – 53,70; Н – 6,50; N – 9,10; $C_{14}H_{20}O_6N_2$; вычислено, %: С – 53,85; Н – 6,41; N – 8,97.

Изучение процессов термодеструкции. 2,5 мг синтезированного продукта смешивали с

250 мг предварительно прокаленного (600 °С, 4 ч) KBr, полученную массу измельчали и прессовали на ручном прессе в таблетки диаметром 10 мм. ИК-Фурье спектры образцов снимали на спектрометре ФСМ-2201 в интервале волновых чисел 400–4000 см⁻¹ с разрешением по волновому числу 4 см⁻¹ (40 сканов). Спектры вторых производных получены в результате численного дифференцирования с использованием сглаживания полиномом 4-го порядка в окнах до 15 точек, анализ и отнесение проводили по экстремумам выше нулевой линии. Спектры регистрировали непосредственно перед испытаниями (25 °С) и после термоокислительного стресса, который моделировали нагреванием таблетированных образцов при 140 °С в течение 3 ч в свободно-аэрируемой атмосфере в сушильном шкафу [3, 7]. Образцы после термостатирования и регистрации колебательных спектров помещали в 96%-й раствор этанола (50 мл) на 10 ч. Электронные спектры спирторастворимой фракции снимали в кварцевых кюветках (*l* = 1 см) на спектрофотометре СФ-2000 в интервале длин волн 200–800 нм с шагом 5 нм, спектры отражения – на приставке МНПВО-36 с разрешением 4 см⁻¹ (60 сканов).

1%-ую суспензию синтезированного продукта в вазелиновом масле готовили смешением и растиранием требуемых количеств компонентов (2,5 мг продукта и 0,3 мл масла) и наносили тонким слоем на инертную подложку из KBr диаметром 40 мм. Термостатирование проводили в условиях, аналогичных описанным выше. Съемка колебательных спектров велась в интервале волновых чисел 400–4000 см⁻¹ с разрешением по волновому числу 4 см⁻¹ с использованием чистой KBr-подложки для регистрации опорного спектра. После испытаний проводили экстракцию твердых продуктов деструкции в 96%-м этаноле, электронные и колебательные спектры спирторастворимой фракции регистрировали аналогично описанному выше.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе N-гликозилирования происходит образование маннозиламина, структурные особенности которого отражаются в колебательном спектре (рис. 1, спектр 1). Полоса при 1018 см⁻¹ относится к C₁-N колебаниям аномерного центра гликозиламина [10], при этом несколько пиков в области 1010–1090 см⁻¹ подтверждают пиранозную форму гликозидного остатка.

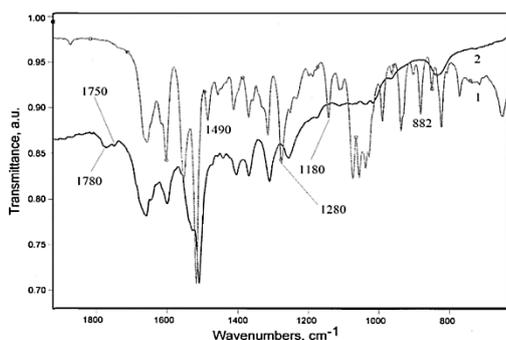
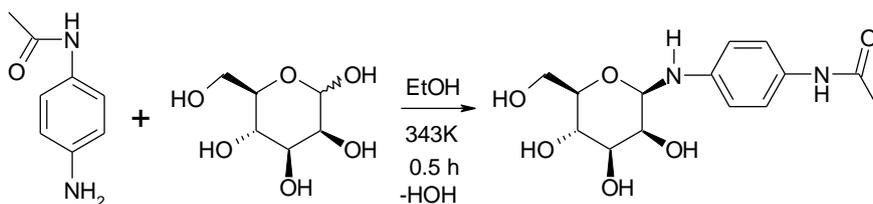


Рис. 1. ИК-Фурье спектры маннозиламина в KBr-матрице при температуре, °С: 1 – 25; 2 – 140, 3 ч

Fig. 1. IR-Fourier transform spectra of mannosylamine in KBr-matrix: 1 – 25 °С; 2 – 140 °С, 3 h

Полоса 882 см⁻¹ ($\delta_{C_1-N_{axial}}$) свидетельствует о преимущественной β -конфигурации аномерного центра [11]. Таким образом, синтезированный продукт является *l*-(N- β -D-маннопиранозиламино)ацетанилидом.

Термодеструкция маннозиламина в KBr-матрице сопровождается интенсивным окрашиванием и изменяет профиль спектра (см. рис. 1, спектр 2): полосы, характеризующие функциона-

лизацию ацетанилида 1500–1660 см⁻¹ ($\nu_{C=O}$, δ_{NH} , $\nu_{C=C}$) сохраняют свое положение и интенсивность, что свидетельствует об отсутствии трансформации аминного фрагмента [6]. Частоты углеводных фрагментов (850–1100 см⁻¹) в спектре не зафиксированы, что свидетельствует о деструкции гликозидного кольца. Интенсивная полоса 1280 см⁻¹, относимая к валентным колебаниям C-N-C_{ar} алкилариламинов [8], нивелируется и смещается в низкочастотную область на 20 см⁻¹, что вероятно, свидетельствует о термическом элиминировании амина [4]. Отмечено уширение полос при 1540 см⁻¹ (поглощение -C(OH)=CH-C(O)-) [12] и в области 1620–1700 см⁻¹, что можно отнести к колебаниям O=C-C=C-фрагментов, образующихся в ходе меланоидинообразования. Более отчетливо появление новых полос проявилось в спектрах вторых производных (рис. 2), в частности, зарегистрированы полоса 1645 см⁻¹ (гидроксиеноны) и дублет 1680 и 1690 см⁻¹ (еноны) [13].

Важно отметить, что появляются полосы 1750 и 1780 см⁻¹, относимые к $\nu_{C=O}$ колебаниям сложных эфиров, γ,δ -лактонов [13], образующихся также в результате трансформации первичных продуктов распада маннозиламина.

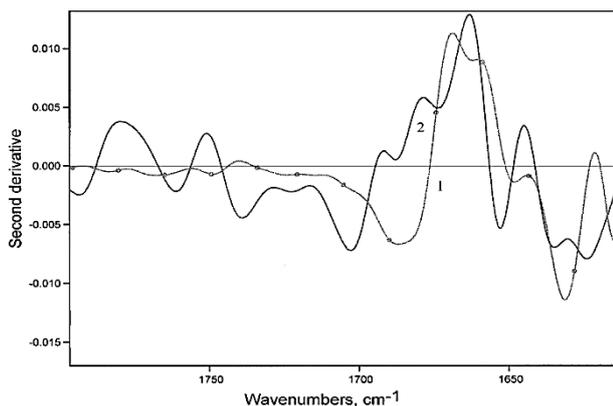


Рис. 2. Вторые производные полос ИК-Фурье спектров маннозиламина в KBr-матрице при температуре, °C: 1 – 25; 2 – 140, 3 ч

Fig. 2. IR-Fourier transform spectral bands second derivatives of mannosylamine in KBr-matrix: 1 – 25 °C; 2 – 140 °C, 3 h

Изучение процессов термодеструкции суспензий маннозиламина в вазелиновом масле позволяет моделировать процессы в системе с ограниченным доступом кислорода. При этом масло в условиях эксперимента практически не растворяет продукты термодеструкции и слабо подвергается окислению [14], что подтверждается визуальными наблюдениями и характером ИК-Фурье спектра (рис. 3, спектр 1). Сравнение спектров суспензий до и после термообработки (рис. 3, спектры 3 и 2) показывает меньшую в сравнении с деструкцией в KBr-матрице степень трансформации структуры в условиях эксперимента, в частности, сохраняются углеводные полосы в интервале 900–1100 cm^{-1} . Тем не менее изменения профиля спектров происходят при тех же частотах: полоса 1282 cm^{-1} смещается к значениям 1263 cm^{-1} , характерным для колебаний первичной аминогруппы аминокетанилида [6]. Аналогичное описанному для KBr-системы уширение полосы в области 1620–1680 cm^{-1} отвечает образованию продуктов, содержащих карбонильную функцию в различном структурном окружении. Полосы 1403, 1750 и 1780 cm^{-1} , как было сказано выше, относятся к колебаниям карбоксильных и сложноэфирных/лактонных функций. В высокочастотной области полосы 3450, 3330 cm^{-1} ($\nu_{\text{OH, NH}}$) смещаются к значениям 3280 cm^{-1} , что указывает на образование ассоциатов, стабилизированных водородными связями [3].

Детальный анализ спектральной области 1700–1850 cm^{-1} показывает, что сигналы 1750 и 1780 cm^{-1} отчетливо проявляются только через 2 ч термостатирования, вероятно, из поздних менее реакционноспособных интермедиатов (рис. 4).

Полосы 825 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1517 ($\nu_{\text{C=C}}$) cm^{-1} , характеризующие 1,4-дизамещенное бензольное кольцо, 1665 ($\nu_{\text{C=O}}$, δ_{NH}) и 1380 (δ_{CH_3}) cm^{-1} также со-

храняют свою интенсивность, что свидетельствует об отсутствии трансформации *l*-аминоацетанилидного фрагмента в процессе термостатирования [6–8]. Кроме того, в отличие от процессов в растворах [5], образования азотсодержащих гетероциклов в процессе деструкции маннозиламина не происходит, на что указывает отсутствие характерных для меланоидиновых N-гетероциклов полос [4, 5] вследствие преимущественного образования ациклических сопряженных систем и производных карбоновых кислот в ходе процессов [15].

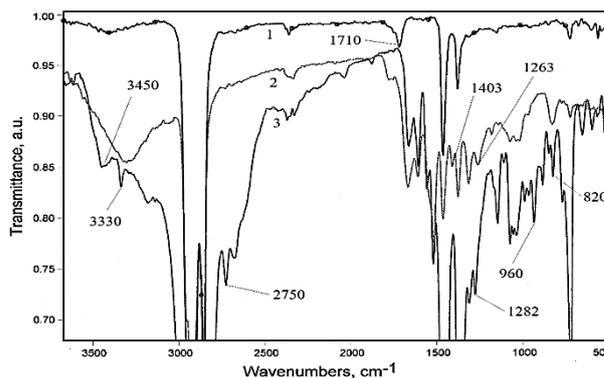


Рис. 3. ИК-Фурье спектры: 1 – вазелиновое масло (140 °C, 3 ч); 2 – суспензия маннозиламина (140 °C, 3 ч); 3 – суспензии маннозиламина (25 °C)

Fig. 3. IR-Fourier transform spectra: 1 – vaseline oil (140 °C, 3 h); 2 – mannosylamine-suspension (140 °C, 3 h); 3 – mannosylamine-suspension (25 °C)

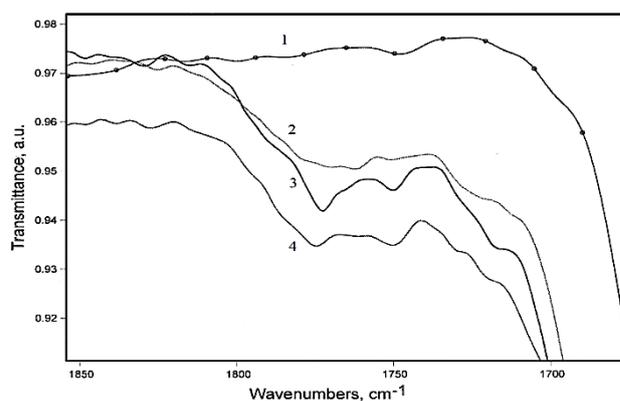


Рис. 4. Фрагменты ИК-Фурье спектров суспензии маннозиламина: 1 – 25 °C; 2 – 140 °C, 1 ч; 3 – 140 °C, 2 ч; 4 – 140 °C, 3 ч

Fig. 4. IR-Fourier transform spectra fragments of mannosylamine-suspension: 1 – 25 °C; 2 – 140 °C, 1 h; 3 – 140 °C, 2 h; 4 – 140 °C, 3 h

Спектры МНПВО фракции спирторастворимых продуктов представлены на рис. 5. Сравнение спектров с представленными выше показывает перераспределение интенсивности полос в пользу частоты 1750 cm^{-1} , при этом появляется

обертон при 1925 см^{-1} , регистрирующийся в спектрах первичных ариламинов [6, 16].

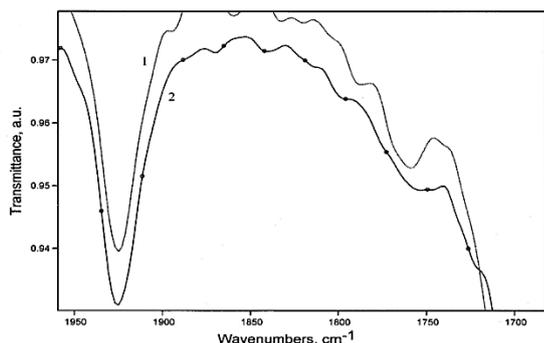


Рис. 5. Фрагменты МНПВО-спектров спирторастворимых продуктов деструкции маннозиламина, экстрагированных из: 1 – суспензии; 2 – KBr-матрицы

Fig. 5. ATR-spectra fragments of ethanol-soluble mannosylamine destruction products extracted from: 1 – suspension; 2 – KBr-matrix

Усиление обертонной интенсивности обусловлено дополнительным вкладом $\text{-OH}\cdots\text{O}$ -поглощения дикарбонильных хромофоров меланоидиновых структур [17]. Нивелирование полосы 1780 см^{-1} с симбатным усилением 1750 см^{-1} связано, вероятно, с лабильностью лактонов в среде нуклеофильного растворителя, обеславливающей их рециклизацию в растворах [18].

Электронные спектры позволяют получить дополнительную информацию о природе хромофоров (рис. 6).

Характерный для меланоидинов максимум поглощения при 260 нм [19] регистрируется для обеих систем; поглощение в данной области связано с наличием $[\text{CH}(\text{OH})=\text{CH}-\text{C}=\text{O}]$ -хромофорных фрагментов [20]. Область непрерывного поглощения $\lambda > 300\text{ нм}$, включающая изгиб при 400 нм , обу-

словлена образованием протяженных хромофоров. Последняя сильнее выражена для продуктов, экстрагированных из суспензии, что может быть связано с меньшей степенью протекания окислительных процессов, препятствующих образованию хромофоров [21].

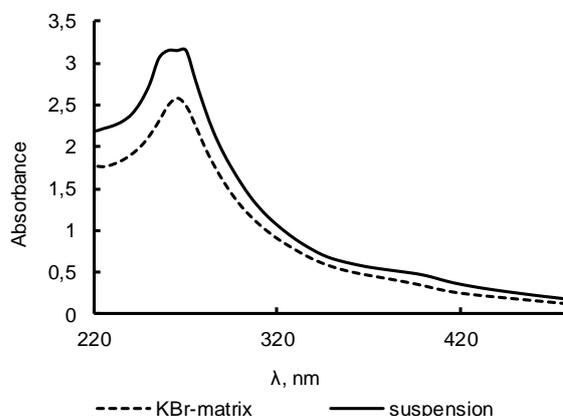
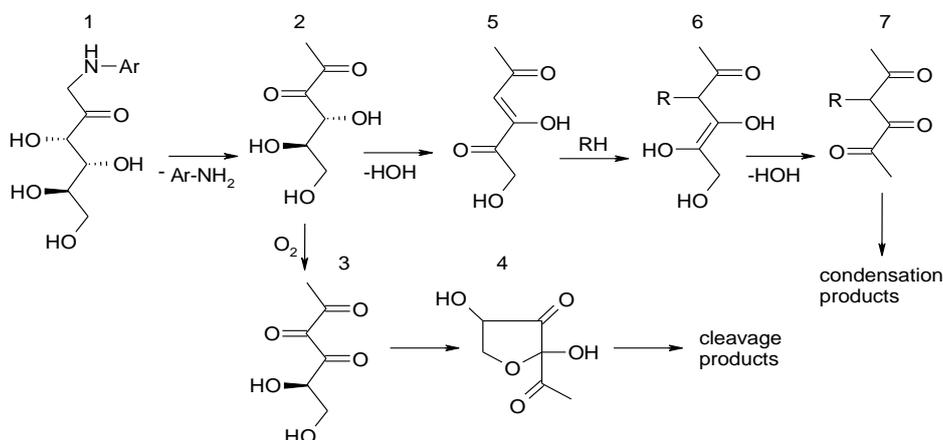


Рис. 6. Электронные спектры спирторастворимых фракций продуктов деструкции маннозиламина

Fig. 6. Electronic spectra of ethanol-soluble fractions of mannosylamine destruction products

Механизмы формирования описанных выше структур можно представить следующим образом. Достаточная основность амина позволяет маннозиламину претерпевать перегруппировку Амадори [22], продукт (1) которой распадается с образованием реакционноспособных интермедиатов: 1-дезоксоэнона (2) и 3-дезоксоэнона (8) [1]. Дальнейшие превращения более реакционноспособного 1-дезоксоэнона возможны по нескольким направлениям:

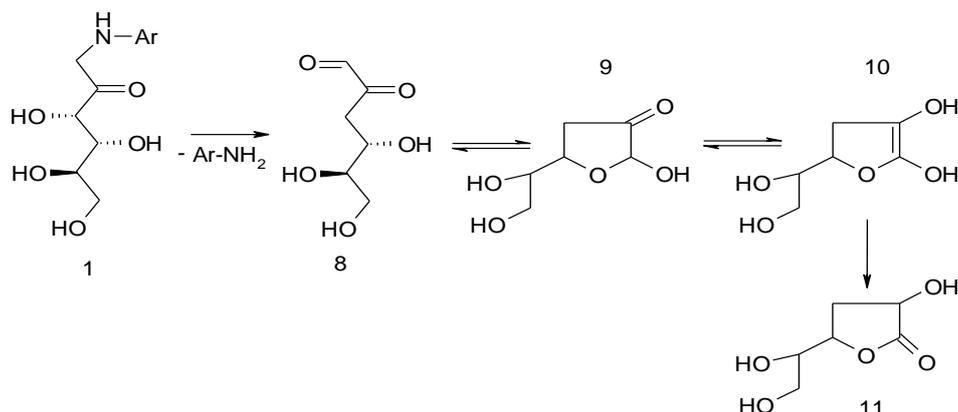


Окисление (2) кислородом воздуха (KBr-матрица) приводит к триоксопроизводному (3), продукт циклизации (4) которого [21] подвергается распаду с образованием низкомолекулярных продуктов [22, 23]. В системах с ограниченным

доступом кислорода (суспензия в вазелиновом масле) реализуются процессы дегидратации дезоксоэнона (2) с образованием редуктонов (5), способных помимо расщепления давать продукты конденсации (6), (7) [23]. 3-дезоксоэноны (8)

менее активны в сравнении с (2), при этом также склонны как к процессам фрагментации [1], так и

к процессам циклизации, в том числе с образованием лактонов [22]:



Следует отметить, что процессы фрагментации существенно преобладают в растворах в условиях кислотного или основного катализа и несколько усиливаются при аэрации [1, 2, 22]. Данное заключение в целом согласуется с полученными нами результатами: дезоксозоны (1), (8) преимущественно подвергаются дегидратации и циклизации, а их продукты способны к дальнейшим превращениям с образованием окрашенных олиго- и полимеров [24]. При этом преобладают реакции перекрестной конденсации, препятствующие образованию гетероциклов (пирролов, фуранов), которое имеет место в условиях кислотно-катализируемого меланоидинообразования в растворах [3, 5].

Следует также отметить, что вазелиновое масло в суспензии маннозиламина практически не подвергается окислению (рис. 7).

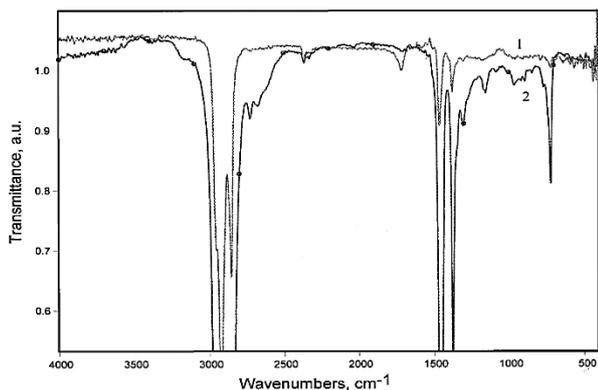


Рис. 7. ИК-Фурье спектры вазелинового масла после термостатирования (140 °С, 3 ч):
 1 – исходное; 2 – отобранное из суспензии маннозиламина

Fig. 7. IR-Fourier transform spectra of vaseline oil after thermostating (140 °С, 3 h):
 1 – initial; 2 – isolated from mannosylamine suspension

Полоса 1710 см⁻¹, характеризующая продукты окисления масла [14] в спектре пробы, отобранной из суспензии маннозиламин, термостатированной в течение 3 ч, практически не регистрируется. Последнее обстоятельство предполагает перспективность синтезированного продукта в качестве антиокислительного агента для предотвращения окисления масел и полимеров.

ВЫВОДЫ

Методами электронной и колебательной спектроскопии изучена термодеструкция продукта конденсации *D*-маннозы с *l*-аминоацетанилидом в системах без растворителя, в частности, вазелиновом масле и КВг-матрице. Показано, что механизмы термораспада в обеих системах однотипны, включают перегруппировку Амадори, элиминирование свободного амина и дальнейшую трансформацию дезоксозонов. Установлено также, что на фоне полисопряженных меланоидиновых структур происходит образование сложных эфиров и лактонов; последние достаточно лабильны и дециклизируются в растворах. В отличие от процессов в растворах образования азотсодержащих гетероциклов в процессе деструкции маннозиламина не наблюдается, на что указывает отсутствие характерных для меланоидиновых *N*-гетероциклов полос в ИК-Фурье спектрах вследствие преимущественного образования енонов и производных карбоновых кислот. Дополнительно следует отметить отсутствие существенных превращений агликона в принятых условиях эксперимента, что, вероятно, связано с более легкой термодеструкцией углеводных фрагментов. Полученные результаты могут быть полезны как при выборе условий получения продуктов реакции Майяра, так и при разработке методов синтеза антиокислительных агентов для защиты от окисления полимеров и масел.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Gobert J., Glomb M.A. Degradation of glucose: reinvestigation of reactive α -dicarbonyl compounds // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. Vol. 57. Issue 18. P. 8591–8597. <https://doi.org/10.1021/jf9019085>
2. Wnorowski A., Yaylayan V. Influence of pyrolytic and aqueous-phase reactions on the mechanism of formation of Maillard products // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. Vol. 48. Issue 8. P. 3549–3554. <https://doi.org/10.1021/jf9913099>
3. Rubinsztain Y., Yariv S., Ioselis P., Aizenshtat Z., Ikan R. Characterization of melanoidins by IR spectroscopy – I. Galactose – glycine melanoidins // *Organic Geochemistry*. 1986. Vol. 9. Issue 3. P. 117–125. [https://doi.org/10.1016/0146-6380\(86\)90101-4](https://doi.org/10.1016/0146-6380(86)90101-4)
4. Черепанов И.С., Абдуллина Г.М. Изучение диализуемых меланоидиновых фракций водно-этанольных систем *D*-лактоза – ариламин // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2017. Т. 7. N 2. С. 181–184. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-2-181-184>
5. Черепанов И.С., Абдуллина Г.М., Корнев В.И. Взаимодействие *D*-лактозы с ароматическими аминами в водно-этанольной среде // *Бутовские сообщения*. 2016. Т. 46. N 4. С. 71–76.
6. Abraham J.P., Sajan D., Joe I.H., Jayakumar J.S. Molecular structure, spectroscopic studies and first-order molecular hyperpolarizabilities of *p*-amino acetanilide // *Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2008. Vol. 71. Issue 2. P. 355–367. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2008.01.010>
7. Gatial A., Polovkova A., Breza M. Quantum-chemical study of N,N'-diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD) dehydrogenation // *Acta Chimica Slovaca*. 2008. Vol. 1. Issue 1. P. 72–84.
8. Ahmad I., Ullah J., Ishaq M., Khan H., Gul K., Sibbiqui S., et al. Monitoring of oxidation behavior in mineral base oil additized with biomass derived antioxidant using FT-IR spectroscopy // *RSC Advances*. 2015. Vol. 5. P. 101089–101100. <https://doi.org/10.1039/C5RA17753G>
9. Черепанов И.С. Синтез и антиокислительная активность продуктов конденсации *D*-глюкозы с *l*-аминоацетанилидом // *Химия и технология органических веществ*. 2020. N 3 (15). С. 71–78.
10. Kulakov I.V. Synthesis of new N-aminoglycosides based on halo-substituted *p*-phenylenediamines and *p*-aminophenols // *Chemistry of Natural Compounds*. 2009. Vol. 45. Issue 4. P. 522–524. <https://doi.org/10.1007/s10600-009-9392-0>
11. Kublashvili R. N-glucosides of aminobenzoic acids and aminophenols // *Chemistry of Natural Compounds*. 2003. Vol. 39. Issue 6. P. 586–588.
12. Lewin M., Ziderman I., Weiss N., Basch A., Ettinger A. Chromogen formation during alkaline degradation of hydrocellulose and cellobiose // *Carbohydrate Research*. 1978. Vol. 62. P. 393–398.
13. Lievens C., Mourant D., He M., Gunawan R., Li X., Li C.-Z. An FT-IR spectroscopic study of carbonyl functionalities in bio-oil // *Fuel*. 2011. Vol. 90. Issue 11. P. 3417–3423. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.06.011>
14. Sokolov A.V., Alekseev E.E., Khizhnyak S.D., Galytsin V.P., Pakhomov P.M. Thermooxidative destruction of solvent during production high-strength fibers of ultrahigh-molecular polyethylene (UHMPE) by gel-formation method // *Fibre Chemistry*. 2018. Vol. 50. Issue 4. P. 270–273. <https://doi.org/10.1007/s10692-019-09974-7>
15. Haffenden L.J.W., Yaylayan V.A. Nonvolatile oxidation products of glucose in Maillard model systems: formation of saccharinic and aldonic acids and their corresponding lactones // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008. Vol. 56. Issue 5. P. 1638–1643. <https://doi.org/10.1021/jf073290c>
16. Kavitha E., Sundaraganesan N., Sebastian S. Molecular structure, vibrational spectroscopic and HOMO, LUMO studies of 4-nitroaniline by density functional method // *Indian Journal of Pure & Applied Physics*. 2010. Vol. 48. P. 20–30.
17. Homma S., Terasawa N., Kubo T., Yoneyawa-Ishii N., Aida K., Fujimaki M. Changes in chemical properties of melanoidins by oxidation and reduction // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 1997. Vol. 61. Issue 3. P. 533–535. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.533>
18. Wolf D., Hoffman C., Aldrich P., Skeggs H., Wright L., Folkers K. Determination of structure of β , δ -dihydroxy- β -methylvaleric acid // *Nutrition Reviews*. 1986. Vol. 44. Issue 10. P. 337–339. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1986.tb07563.x>
19. Nonier M., Vivas N., Vivas de Gaulejas N., Mouche C., Rossy Huguet C., Daugey N. Purification and partial characterization of melanoidins fractions from toasted oak heartwood, comparison with melanoidins from roasted coffee // *Journal of Food Research*. 2018. Vol. 7. Issue 6. P. 37–57. <https://doi.org/10.5539/jfr.v7n6p37>
20. Lewin M. Oxidation and aging of cellulose // *Macromolecular Symposia*. 1997. Vol. 118. Issue 1. P. 715–724. <https://doi.org/10.1002/masy.19971180192>
21. Voigt M., Smuda M., Pfahler C., Glomb M.A. Oxygen-dependent fragmentation reactions during the degradation 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. Vol. 58. Issue 9. P. 5685–5691. <https://doi.org/10.1021/jf100140h>
22. Beck J., Ledi F., Sengl M., Severin T. Formation of acids, lactones and esters through the Maillard reaction // *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 1990. Vol. 190. Issue 3. P. 212–216. <https://doi.org/10.1007/BF01192968>
23. Moshin G., Schmitt F.-J., Kanzler C., Epping J.D., Flemig S., Hornemann A. Structural characterization of melanoidins formed from *D*-glucose and *L*-alanine at different temperatures applied FTIR, NMR, EPR and MALDI-ToF-MS // *Food Chemistry*. 2018. Vol. 245. P. 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.115>

REFERENCES

1. Gobert J, Glomb MA. Degradation of glucose: reinvestigation of reactive α -dicarbonyl compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57(18):8591–8597. <https://doi.org/10.1021/jf9019085>
2. Wnorowski A, Yaylayan V. Influence of pyrolytic and aqueous-phase reactions on the mechanism of formation of Maillard products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(8):3549–3554. <https://doi.org/10.1021/jf9913099>
3. Rubinsztain Y, Yariv S, Ioselis P, Aizenshtat Z, Ikan R. Characterization of melanoidins by IR spectroscopy – I. Galactose – glycine melanoidins. *Organic Geochemistry*. 1986;9(3):117–125. [https://doi.org/10.1016/0146-6380\(86\)90101-4](https://doi.org/10.1016/0146-6380(86)90101-4)
4. Cherepanov IS, Abdullina GM. Study of dialyzable melanoidin fractions in aqueous-ethanolic D-lactose – aryl amine systems. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017;7(2):181–184. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-2-181-184>
5. Cherepanov IS, Abdullina GM, Kornev VI. Interaction of D-lactose with aromatic amines in aqueous-ethanolic medium. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communication*. 2016;46(4):71–76. (In Russian)
6. Abraham JP, Sajan D, Joe IH, Jayakumar JS. Molecular structure, spectroscopic studies and first-order molecular hyperpolarizabilities of *p*-aminoacetanilide. *Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2008;71(2):355–367. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2008.01.010>
7. Gatial A, Polovkova A, Breza M. Quantum-chemical study of N,N'-diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD) dehydrogenation. *Acta Chimica Slovaca*. 2008;1(1):72–84.
8. Ahmad I, Ullah J, Ishaq M, Khan H, Gul K, Sibbiqui S, et al. Monitoring of oxidation behavior in mineral base oil additized with biomass derived antioxidant using FT-IR spectroscopy. *RSC Advances*. 2015;5:101089–101100. <https://doi.org/10.1039/C5RA17753G>
9. Cherepanov IS. Synthesis and antioxidative activity of D-glucose – *p*-aminoacetanilide condensation product. *Khimiya i tekhnologiya organicheskikh vestchestv = Chemistry and Technology of Organic Substances*. 2020;3:71–78 (In Russian)
10. Kulakov IV. Synthesis of new N-aminoglycosides based on halo-substituted *p*-phenylenediamines and *p*-aminophenols. *Chemistry of Natural Compounds*. 2009;45(4):522–524. <https://doi.org/10.1007/s10600-009-9392-0>
11. Kublashvili R. N-glucosides of aminobenzoic acids and aminophenols. *Chemistry of Natural Compounds*. 2003;39(6):586–588.
12. Lewin M, Ziderman I, Weiss N, Basch A, Ettinger A. Chromogen formation during alkaline degradation of hydrocellulose and cellobiose. *Carbohydrate Research*. 1978;62:393–398.
13. Lievens C, Mourant D, He M, Gunawan R, Li X, Li C-Z. An FT-IR spectroscopic study of carbonyl functionalities in bio-oil. *Fuel*. 2011;90(11):3417–3423. <https://doi.org/10.1016/J.fuel.2011.06.011>
14. Sokolov AV, Alekseev EE, Khizhnyak SD, Galitsin VP, Pakhomov PM. Thermooxidative destruction of solvent during production high-strength fibers of ultrahigh-molecular polyethylene (UHMPE) by gel-formation method. *Fibre Chemistry*. 2018;50(4):270–273. <https://doi.org/10.1007/s10692-019-09974-7>
15. Haffenden LJW, Yaylayan VA. Nonvolatile oxidation products of glucose in Maillard model systems: formation of saccharinic and aldonic acids and their corresponding lactones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(5):1638–1643. <https://doi.org/10.1021/jf073290c>
16. Kavitha E, Sundaraganesan N, Sebastian S. Molecular structure, vibrational spectroscopic and HOMO, LUMO studies of 4-nitroaniline by density functional method. *Indian Journal of Pure & Applied Physics*. 2010;48:20–30.
17. Homma S, Terasawa N, Kubo T, Yoneyawashii N, Aida K, Fujimaki M. Changes in chemical properties of melanoidins by oxidation and reduction. *Bio-science, Biotechnology and Biochemistry*. 1997;61(3):533–535. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.533>
18. Wolf D, Hoffman C, Aldrich P, Skeggs H, Wright L, Folkers K. Determination of structure of β , δ -dihydroxy- β -methylvaleric acid. *Nutrition Reviews*. 1986;44(10):337–339. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1986.tb07563.x>
19. Nonier M, Vivas N, Vivas de Gaulejas N, Mouche C, Rossy Huguet C, Daugey N. Purification and partial characterization of melanoidins fractions from toasted oak heartwood, comparison with melanoidins from roasted coffee. *Journal of Food Research*. 2018;7(6):37–57. <https://doi.org/10.5539/jfr.v7n6p37>
20. Lewin M. Oxidation and aging of cellulose. *Macromolecular Symposia*. 1997;118(1):715–724. <https://doi.org/10.1002/masy.19971180192>
21. Voigt M, Smuda M, Pfahler C, Glomb MA. Oxygen-dependent fragmentation reactions during the degradation 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(9):5685–5691. <https://doi.org/10.1021/jf100140h>
22. Beck J, Ledi F, Sengl M, Severin T. Formation of acids, lactones and esters through the Maillard reaction. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung = Journal of Food Study and Research*. 1990;190(3):212–216. <https://doi.org/10.1007/BF01192968>
23. Moshin G, Schmitt F-J, Kanzler C, Epping JD, Flemig S, Hornemann A. Structural characterization of melanoidins formed from D-glucose and L-alanine at different temperatures applied FTIR, NMR, EPR and MALDI-ToF-MS. *Food Chemistry*. 2018;245:761–767. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.115>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Черепанов Игорь Сергеевич,
к.х.н., доцент,
Удмуртский государственный университет,
426034, г. Ижевск, ул. Университетская, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: cherchem@mail.ru

Заявленный вклад автора

Черепанов И.С. выполнил экспериментальную работу, обобщил полученные результаты и написал рукопись. Автор имеет на статью исключительные авторские права и несет ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Автор прочел и одобрил окончательный вариант рукописи.

Статья поступила в редакцию 28.10.2020; одобрена после рецензирования 23.11.2020; принята к публикации 30.11.2020.

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Igor S. Cherepanov,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Udmurt State University,
1, Universitetskaya St., Izhevsk, 426034,
Russian Federation,
✉ e-mail: cherchem@mail.ru

Contribution of the author's

Igor S. Cherepanov carried out the experimental work, analyzed the experimental results and prepared the text of the manuscript. Author has exclusive author's right and bear responsibility for plagiarism.

Conflict interests

The author declares no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by the author.

The article was submitted 28.10.2020; approved after reviewing 23.11.2020; accepted for publication 30.11.2020.

Оригинальная статья / Original article

УДК 615, 614.35, 547.9, 57.044, 57.083.1, 543.95, 543.55, 543.424

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-590-602>



Методика электрохимического биотестирования в применении к сравнительному анализу антибиотических свойств растительных экстрактов, получаемых с помощью сжиженного CO₂

© В.С. Сибирцев, У.Ю. Нечипоренко, В.Л. Кабанов,
О.В. Буханцев

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок –
филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН,
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Резюме: Описана методика биотестирования, предусматривающая периодическую (через каждые 2 ч) регистрацию изменений pH, редокс-потенциала и электропроводности жидкой питательной среды, инкубируемой в присутствии и в отсутствие жизнеспособных тестовых микроорганизмов и тестируемых образцов. Представлены результаты проведенного с применением данной методики сравнительного анализа про- и антибиотической активности в отношении *Lactobacillus acidophilus* и других тестовых микроорганизмов, таких как *Chlorella vulgaris* и *Rhodotorula glutinis*, различных концентраций цельных докритических экстрактов, полученных с помощью сжиженного CO₂ из 10 разных видов растительного сырья. Показано, что с помощью представленной методики можно более экспрессно, объективно и информативно, а также менее материало- и трудоёмко, чем при использовании стандартных визуальных методов микробиологического тестирования, оценивать влияние образцов различной фармацевтической, пищевой и иной продукции на динамику жизненной активности тестовых микроорганизмов. Среди исследованных нами растительных экстрактов наиболее активные пролонгированные антибиотические свойства проявили экстракты из корней чистотела большого (*Chelidonium majus*) и цветков календулы лекарственной (*Calendula officinalis*) в концентрациях от 3% об. и выше, в то время как наиболее активные пролонгированные пробиотические свойства проявили экстракты из побегов омелы белой (*Viscum album*) и листьев грецкого ореха (*Juglans regia*) в концентрации 0,2% об. Начальная про- и антибиотическая активность протестированных экстрактов в большинстве случаев была больше их пролонгированной активности. В то же время среднесрочная (по времени взаимодействия протестированных экстрактов с тестовыми микроорганизмами) про- и антибиотическая активность протестированных экстрактов, как правило, была промежуточной по величине между их начальной и пролонгированной активностью. При этом с уменьшением концентрации протестированных экстрактов в тестовой среде их антибиотическая активность монотонно уменьшалась, тогда как пробиотическая активность увеличивалась. Таким образом, очевидно, что про- и антибиотическая активность фармацевтической, пищевой и иной продукции, в том числе включающей различные растительные экстракты, в значительной мере определяется выбором не только сырья и способа экстрагирования из него биологически активных веществ, но и концентрацией экстракта в продукции, временем ее взаимодействия с микробиотой и другими живыми организмами, а также множеством других факторов. Причем точный характер этих зависимостей в большинстве случаев может быть установлен лишь с помощью значительного числа тестовых испытаний, которые удобно проводить с помощью представленной в этой работе методики.

Ключевые слова: антибиотические свойства, микробиологическое тестирование, электрохимические методы, растительные экстракты, биологически активные вещества

Для цитирования: Сибирцев В.С., Нечипоренко У.Ю., Кабанов В.Л., Буханцев О.В. Методика электрохимического биотестирования в применении к сравнительному анализу антибиотических свойств растительных экстрактов, получаемых с помощью сжиженного CO₂. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 4. С. 590–602. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-590-602>

Use of an electrochemical biotesting technique for comparing the antibiotic properties of plant extracts obtained using liquefied CO₂

Vladimir S. Sibirtsev, Uliana Yu. Nechiporenko, Vladimir L. Kabanov,
Oleg V. Bukhantsev

All-Russia Research Institute for Food Additives –
Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS,
St. Petersburg, Russian Federation

Abstract: We present a biotesting technique that allows periodic (every 2 hours) recording of changes in the pH, redox potential and electrical conductivity of a liquid nutrient medium incubated in the presence or absence of viable test microorganisms and test samples. This technique was used to compare the pro- and antibiotic activity of various concentrations of subcritical whole extracts obtained from 10 plant species using liquefied CO₂ against *Lactobacillus acidophilus* and other test microorganisms, such as *Chlorella vulgaris* and *Rhodotorula glutinis*. It was established that the proposed technique provides for a quicker, more objective and informative, as well as less material-consuming and labour-intensive, microbiological testing compared to conventional visual methods aimed at assessing effects of pharmaceutical, food and other products on the activity of test microorganisms. Among the studied plant varieties, extracts from celandine roots (*Chelidonium majus*) and calendula officinalis flowers (*Calendula officinalis*) at a concentration of 3% vol. and above demonstrated the most active prolonged antibiotic properties. Extracts from mistletoe shoots (*Viscum album*) and walnut leaves (*Juglans regia*) at a concentration of 0.2% vol. showed the most active prolonged probiotic properties. The initial pro- and antibiotic activity of the tested extracts was in most cases greater than their prolonged activity. At the same time, the medium-term (with respect to the period of interaction of the extracts and microorganisms) pro- and antibiotic activity of the tested extracts showed intermediate values between their initial and prolonged activity. It is noteworthy that a decrease in the concentration of the tested extracts in the test environment led to a steady decrease in their antibiotic activity, at the same time as increasing their probiotic activity. Thus, it is clear that the pro- and antibiotic activity of pharmaceutical, food and other products, including various plant extracts, is determined not only by the choice of raw materials and the method for extracting biologically active substances, but also by the concentration of extracts, the time of their interaction with microbiota and other living organisms, as well as by a variety of other factors. The exact nature of these dependencies can only be established through multiple tests, which can conveniently be carried out using the methodology presented in this work.

Keywords: antibiotic properties, microbiological testing, electrochemical methods, plant extracts, biologically active substances

For citation: Sibirtsev VS, Nechiporenko UYu, Kabanov VL, Bukhantsev OV. Use of an electrochemical biotesting technique for comparing the antibiotic properties of plant extracts obtained using liquefied CO₂. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):590–602. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-590-602>

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время в фармацевтической, пищевой и многих других отраслях народного хозяйства все более актуальной становится проблема разработки достаточно объективных и в то же время экспрессных и доступных для широкого применения способов оценки влияния различных химических соединений как синтетического, так и природного происхождения на динамику жизнедеятельности разных видов и штаммов микроорганизмов, которые могут входить в состав естественной микробиоты человека и других многоклеточных живых организмов, вызывать различные инфекционные заболевания,

токсикозы, аллергические реакции, способствовать порче пищевой и иной продукции, участвовать в различных биотехнологических процессах и т.д.

Однако принятые в настоящее время в качестве стандартных при микробиологическом тестировании процедуры визуальной оценки общей выживаемости микроорганизмов либо величины зоны задержки роста их колоний требуют для своего проведения значительных затрат материалов, времени и труда квалифицированного персонала, давая в результате лишь весьма неполную, субъективную и «статичную» информацию о нарушениях жизнедеятельности тестовых

организмов [1–5]. Таким образом, перспективным представляется использование в микробиологическом тестировании инструментальных технологий, среди которых наиболее простыми в исполнении, достоверными и универсальными являются различные оптические и электрохимические методы.

Кроме того, в последнее время в фармацевтической, косметической, пищевой, кормовой и других видах продукции, производимой и потребляемой человеческим обществом, ощущается все больший недостаток биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения, способствующих нормальному развитию и функционированию как самого человеческого организма (ослабленного стрессами, загрязненной окружающей средой, недостатком природного освещения и физической активности, контактами с многочисленной посторонней микробиотой и т.п.), так и симбиотически связанной с ним полезной микробиоты, либо угнетению жизнедеятельности вредной для человека микробиоты.

Производство концентрированных синтетических аналогов БАВ при современном уровне развития технологий часто является затратным с экономической точки зрения, а также малоэффективным вследствие сложности достижения нужной степени чистоты, стереоспецифичности и других параметров, способных обеспечить достаточно высокую степень биологической активности таких соединений. Кроме того, растительные экстракты (РЭ) по сравнению с синтетическими средствами, как правило, обладают существенно меньшими по широте спектра и интенсивности действия на человеческий и другие живые организмы побочными эффектами.

В результате этого РЭ в настоящее время являются одним из наиболее приемлемых и распространенных источников БАВ. В свою очередь из РЭ до настоящего времени наиболее широко применялись «эфирные масла» (ЭМ), промышленно либо лабораторно получаемые из различного растительного сырья разными физико-химическими способами (холодный или горячий отжим, дистилляция, экстрагирование при нормальных либо повышенных давлении и/или температуре с помощью различных органических растворителей с последующим удалением этих растворителей при дополнительно повышенной температуре либо под вакуумом и т.п.) [6]. Получаемые таким образом ЭМ позволяют достичь существенно большей и стабильной во времени биологической активности конечного продукта по сравнению с водными, спиртовыми и иными РЭ, получаемыми без удаления экстрагентов. Благодаря этому ЭМ широко применяются в пищевой, фармацевтической, косметической и других отраслях промышленности в

качестве добавок, обладающих избирательным либо малоспецифическим про- либо антимикробным действием; добавок, обладающих различными видами нормализующего действия (используемого, в том числе, при лечении различных нервных, сердечно-сосудистых, диабетических, пищеварительных и иных заболеваний); а также консервирующих, антиоксидантных, ароматизирующих, вкусовых и иных видов добавок [1–3, 6–15]. Кроме того, ЭМ используются в качестве антисептиков, экологически безопасных инсектицидов и пестицидов, добавок к различным зуботерапевтическим, ранозаживляющим и другим медицинским и упаковочным материалам и т.п. [16–21].

Однако в последнее время наряду с ЭМ все большее применение находят экстракты, получаемые из аналогичного растительного сырья с использованием в качестве экстрагента сжиженного углекислого газа (CO_2), который затем полностью удаляется из конечного продукта путем изменения его температуры и давления [22–28]. Состав таких экстрактов характеризуется, как правило, более широким спектром БАВ, чем у ЭМ. При этом, если экстрагирование проводится при давлении выше 7,6 МПа и температуре ниже 31 °С, то такие экстракты называются «докритическими». В противном случае экстракты, получаемые по описанной выше технологии, называются «сверхкритическими» (поскольку CO_2 в них, находясь в сверхкритическом состоянии, проявляет свойства как жидкости, так и газа). Кроме того экстракты, получаемые с помощью сжиженного CO_2 , делятся на «селективные» (получаемые при низких давлениях CO_2 и имеющие состав, близкий к ЭМ) и «цельные» (получаемые при высоких давлениях CO_2 и имеющие в своем составе помимо летучих компонентов, обычных для ЭМ, более тяжелые растительные смолы, парафины, пигменты и т.д.).

В связи с вышесказанным нашей целью являлась разработка экспрессной и доступной для широкого применения методики инструментального микробиологического тестирования и оценка с ее помощью про- и антибиотических свойств экстрактов, получаемых из различного растительного сырья с использованием сжиженного CO_2 .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования были взяты цельные докритические экстракты, произведенные ООО «Казанский завод экстрактов»¹ (г. Казань, Россия) с помощью сжиженного CO_2 при температуре 20 °С и давлении 72 атм из следующих видов растительного сырья: корни солодки голой (*Glycyrrhiza glabra*) (№ 1), цветки мальвы лесной (*Malva sylvestris*) (№ 2), цветки календулы лекарственной (ноготки лекарственные, *Calendula officinalis*) (№ 3), листья и стебли бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium*)

¹Этот завод был выбран потому, что он является в настоящее время крупнейшим в России производителем растительных экстрактов, получаемых с помощью сжиженного CO_2 .

(№ 4), корни чистотела большого (*Chelidonium majus*) (№ 5), листья березы повислой (*Betula pendula*) (№ 6), листья грецкого ореха (*Juglans regia*) (№ 7), молодые побеги омеги белой (*Viscum album*) (№ 8), плоды облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides*) (№ 9), семена перца черного (*Piper nigrum*) (№ 10).

Для анализа влияния различных концентраций тестируемых экстрактов (ТЭ) на динамику жизнедеятельности микроорганизмов, исходя из результатов уже имевшихся авторских наработок по различным способам инструментального биотестирования [29–41], была разработана следующая методика.

Для каждой партии ТЭ проводилось по 4 серии измерений, перед началом каждой из которых готовилась питательная среда, представлявшая собой стерильный водный раствор с $pH = 7,2 \pm 0,2$, содержащий 5 г/л глюкозы, 20 г/л белкового гидролизата и 2 г/л NaCl. Затем эта питательная среда засеивалась 10% об. суспензии, содержащей 10^7 кл/мл тестовых биообъектов, в качестве которых использовались одноклеточные водоросли *Chlorella vulgaris* ATCC 9765, дрожжеподобные грибки *Rhodotorula glutinis* ATCC 10659 и бактерии *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Все эти биообъекты являются типичными представителями широко распространенных в естественных условиях видов микроорганизмов, активно участвующих в деструкции различных биополимеров, принадлежа при этом к существенно отличающимся друг от друга таксономическим группам. Кроме того, *L. Acidophilus* являются нормальным представителем кишечной микробиоты человека и теплокровных животных, а также обладают высокой антагонистической активностью по отношению к гнилостной, условно-патогенной и патогенной микробиоте.

При культивировании представителей разных таксономических групп питательная среда одинакового состава использовалась для того, чтобы обеспечить единообразие общей методики измерения динамики жизненной активности разных тестовых микроорганизмов, а также потому, что белковый гидролизат в сочетании со стерилизованной природной, а не дистиллированной водой, использовавшейся для приготовления упомянутой питательной среды, содержит весь необходимый набор макро- и микроэлементов, обеспечивающих нормальное (хотя, возможно, и не оптимальное в каждом отдельном случае) развитие большинства микроорганизмов. При этом наличие глюкозы ускоряло начальное развитие тестовых микроорганизмов, обеспечивая большую экспрессность предлагаемой методики.

Затем тестовые организмы инкубировались при $37 \pm 0,1$ °C до содержания в питательной среде клеток в пределах $5 \cdot 10^6$ кл./мл (что удостове-

рялось нефелометрическим способом по стандарту мутности). Полученная тестовая среда разливалась по измерительным емкостям (ИЕ), в каждую по 5 мл, представлявшим собой стандартные стеклянные конические пробирки объемом 10 мл, в каждую из которых (за исключением трех контрольных) предварительно добавлялось (по 3 ИЕ в параллель) количество тестируемого объекта (в качестве которого в описываемом исследовании выступали цельные докритические экстракты, получаемые с помощью сжиженного CO₂ из различного растительного сырья), необходимое для достижения заданной его концентрации в тестовой среде.

Затем как тестовые, так и контрольные ИЕ (содержащие ту же среду, что и тестовые ИЕ, но без добавления ТЭ) инкубировали при $37 \pm 0,1$ °C в течение 6 ч. У сред, содержащихся в каждой из ИЕ, последовательно, с интервалом 2 ч регистрировали pH, редокс-потенциал (E , мВ) и удельную линейную низкочастотную электропроводность (X , мСм/см). При этом pH и E регистрировали с помощью иономера Эксперт-001 (Россия) с комбинированными электродами ЭСК-10601/7 и ЭРП-105 соответственно, а X регистрировали с помощью кондуктометра Эксперт-002 (Россия) с датчиком УЭП-П-С, работающим на частоте 1,6 кГц.

После этого общие степени активирования (+) либо ингибирования (–) жизнедеятельности тестовых микроорганизмов заданными концентрациями ТЭ после k часов их совместного инкубирования в жидкой тестовой среде ($\epsilon_{V,k}$, %) рассчитывались по формуле

$$\epsilon_{V,k} = (\epsilon_{pH,k} + 0,7\epsilon_{E,k} + 0,7\epsilon_{X,k}) / 2,4. \quad (1)$$

Величины $\epsilon_{pH,k}$, $\epsilon_{E,k}$ и $\epsilon_{X,k}$ определялись отдельно по результатам измерений pH, E и X у тестовых сред, содержащихся в ИЕ, по формуле:

$$\epsilon_{i,k} = 100 \times (\Delta Y_{i,k} - \Delta Y_{C,i,k}) / \Delta Y_{C,i,k}. \quad (2)$$

Индекс i показывал, по какому параметру (pH, E или X), учитывались измерения в формуле 2, (например $\epsilon_{pH,k} = 100 \times (\Delta Y_{pH,k} - \Delta Y_{C,pH,k}) / \Delta Y_{C,pH,k}$).

Величины $\Delta Y_{i,k}$ и $\Delta Y_{C,i,k}$ определялись как усредненные по выборке из N образцов с одинаковыми концентрациями экстрактов, приготовленных одинаковым способом из одного вида сырья (в нашем случае $N = 3 \cdot 4 = 12$), изменения значений i -параметра тестовой среды (pH, E или X), произошедшие за k часов от начала инкубирования этой среды в присутствии заданной концентрации ТЭ (ΔY_t , наблюдаемое в тестовых ИЕ) либо в отсутствие ТЭ (ΔY_c , наблюдаемое в контрольных ИЕ, тестовые среды в которых содержали жизнеспособные микроорганизмы, но не содержали ТЭ). Например, $\Delta Y_{pH,2} = pH_{T,2} - pH_{T,0}$, $\Delta Y_{E,4} = E_{C,4} - E_{C,0}$ и т.д. (где $pH_{T,0}$ – значение pH среды в тестовой ИЕ в начале ее инкубирования, $pH_{T,2}$ – значение pH среды в тестовой

ИЕ через 2 ч после начала ее инкубирования, $E_{C,0}$ – значение E среды в контрольной ИЕ в начале ее инкубирования, $E_{C,4}$ – значение E среды в контрольной ИЕ через 4 ч после начала ее инкубирования).

Таким образом, величина $\varepsilon_{V,k}$ показывала, на сколько процентов по отношению к контролю ускорялось либо замедлялось преобразование жизнеспособными микроорганизмами, присутствующими в тестовой среде, катаболитов, присутствующих в той же среде, в анаболиты после k часов их инкубации при заданной температуре в присутствии заданной концентрации ТЭ по сравнению с теми же процессами, осуществляемыми теми же микроорганизмами в той же тестовой среде в отсутствие ТЭ.

При этом ошибки определения каждой из усредненных величин $\varepsilon_{pH,k}$, $\varepsilon_{E,k}$ и $\varepsilon_{X,k}$ рассчитывались стандартным образом² [42, 43], как $\Delta\varepsilon_{i,k} = t_{\alpha, N-1} \sigma_{i,k}$, с использованием критерия Стьюдента ($t_{\alpha, N-1}$ для уровня достоверности $\alpha = 0,95$ и числа степеней свободы $N-1$), математического ожидания ($\theta_{i,k} = \sum \varepsilon_{i,k,j} / N$) и его дисперсии ($\sigma_{i,k} = [\sum_j (\varepsilon_{i,k,j} - \theta_{i,k})^2 / (N-1)]^{1/2}$). После чего ошибка определения величины $\Delta\varepsilon_{V,k}$ рассчитывалась по формуле $\Delta\varepsilon_{V,k} = (\Delta\varepsilon_{pH,k} + 0,7\Delta\varepsilon_{E,k} + 0,7\Delta\varepsilon_{X,k}) / 2,4$.

Параметры pH, E и X были выбраны для оценки общей степени активирования либо ингибирования жизнедеятельности тестовых микроорганизмов заданными концентрациями ТЭ потому, что они наиболее надежно измеряются инструментально и при этом чувствительно связаны с тем, насколько ускорялось либо замедлялось преобразование жизнеспособными микроорганизмами, присутствующими в тестовой среде, катаболитов, присутствующих в той же среде, в анаболиты (имеющие иные, чем у катаболитов кислотность, электропроводность и электрохимический окислительно-восстановительный потенциал).

Правомерность объединения в ε_V трех таких величин, как ε_{pH} , ε_E и ε_X , можно объяснить тем, что каждая из этих величин независимо нормировалась на контрольные значения определяющего ее показателя и, таким образом, единообразно (в процентах по отношению к контролю) отражала изменение метаболизма тестовых микроорганизмов в присутствии ТЭ, в то же время несколько по-разному характеризуя это изменение (поскольку изменение pH, E и X тестовой среды обуславливали разные метаболические процессы, осуществляемые присутствующими там жизнеспособными микроорганизмами). В результате чего суммарная величина ε_V более информативно и адекватно характеризовала изменения метаболической активности тестовых микроорганизмов, чем каждая из величин ε_{pH} , ε_E и ε_X по отдельности.

Коэффициенты при $\varepsilon_{i,k}$, указанные в формуле

(1), были рассчитаны методами факторного анализа (аналогично тому, как описано в работах [42, 43]) по значениям, полученным нами для $\varepsilon_{pH,k}$, $\varepsilon_{E,k}$ и $\varepsilon_{X,k}$ в результате применения представленной здесь методики к оценке антибактериальной активности в отношении *L. acidophilus* разных концентраций таких известных антисептиков и антибиотиков широкого спектра действия, как хлоргексидина биклюконат, фурацилин и левомицетин.

Вышесказанное обеспечило 90% достоверную корреляцию величин ε_V , полученных с помощью разработанной нами инструментальной методики биотестирования после 6 ч инкубации тестовых сред с *L. acidophilus* в присутствии и в отсутствие 3% об. ТЭ, с величинами ε_S , полученными для той же концентрации тех же ТЭ с помощью стандартной методики микробиологического тестирования [1–5]. Последняя предусматривает визуальный подсчет колоний *L. Acidophilus*, выросших после 24 ч их инкубации при $37 \pm 0,1$ °C на плотной питательной среде (имеющей тот же состав, что и использовавшаяся нами жидкая питательная среда, но с добавлением 20 г/л микробиологического агар-агара) в присутствии и в отсутствие 3% об. ТЭ с последующим расчетом величины ε_S по формуле (2). При этом высеивание проводилось для нескольких последовательных разведений тестовой среды – каждое в несколько параллельных чашек Петри. После чего отбирались те разведения, при использовании которых на одной чашке Петри выросло не менее 10 и не более 50 колоний тестовых микроорганизмов. Данные по этим разведениям соответствующим образом статистически обрабатывались.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наиболее интересные данные, полученные описанным выше способом, представлены в табл. 1 и 2, а также на рисунке, где по оси ординат отложены значения ε_V (%), определявшиеся для ТЭ по результатам измерений pH, редокс-потенциала и электропроводности жидких питательных сред с *L. acidophilus* через 2, 4 и 6 ч инкубирования по формулам (1) и (2), по оси абсцисс – номера сырья, из которого получали ТЭ (см. табл. 1).

На основании представленных данных можно сделать следующие выводы. Как видно из табл. 1, наиболее пролонгированно чувствительными к присутствию высоких концентраций ТЭ из всех исследованных биообъектов оказались *L. acidophilus*. Поэтому они и были выбраны в качестве тестовых микроорганизмов для дальнейшего более детального исследования про- и антибиотических свойств ТЭ (см. табл. 2).

²Korn G.A., Korn T.M. Mathematical handbook for scientists and engineers. definitions, theorems, and formulas for reference and revie. McGraw Hill Book Company. 1968.

Таблица 1. Степень ингибирования жизнедеятельности тестовых микроорганизмов после 6 ч их инкубирования в присутствии 3% об. тестируемых экстрактов ($\epsilon_{V,6}$, %) **Table 1.** Inhibition degree of test microorganisms vital activity after 6 hours incubation in the presence of 3% vol. tested extracts ($\epsilon_{V,6}$, %)

Тестовые микроорганизмы	Тестируемые экстракты									
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10
<i>C. vulgaris</i>	-37±5	-33±5	-45±6	-41±7	-51±8	-43±6	-42±6	-24±4	-38±5	-34±5
<i>R. glutinis</i>	-33±5	-30±4	-40±6	-36±6	-46±8	-38±6	-38±5	-22±4	-34±5	-30±5
<i>L. acidophilus</i>	-41±7	-37±6	-50±7	-45±6	-57±9	-48±7	-47±7	-27±4	-42±6	-38±6

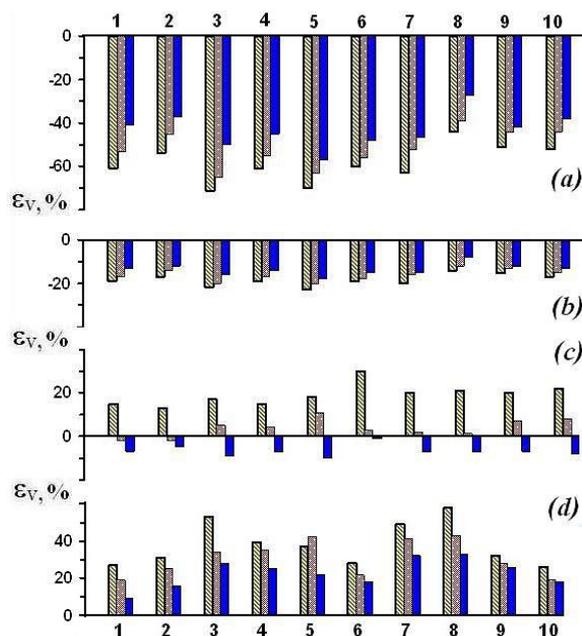
Примечание. Номера цельных докритических экстрактов, произведенных ООО «Казанский завод экстрактов» с помощью сжиженного CO₂ при давлении 7,3 МПа и температуре 20°C, соответствуют следующему растительному сырью, из которого их получали: 1 – корни *Glycyrrhiza glabra*; 2 – цветки *Malva sylvestris*; 3 – цветки *Calendula officinalis*; 4 – трава *Helichrysum arenarium*; 5 – корни *Chelidonium majus*; 6 – листья *Betula pendula*; 7 – листья *Juglans regia*; 8 – молодые побеги *Viscum album*; 9 – плоды *Hipporhae rhamnoides*; 10 – семена *Piper nigrum*. Методику определения ϵ_V см. в разделе «Экспериментальная часть».

Таблица 2. Степени активирования (+) либо ингибирования (-) жизнедеятельности *Lactobacillus acidophilus* (ϵ_V , %) при разной продолжительности их инкубирования в присутствии различных количеств исследуемых растительных экстрактов

Table 2. Activation (+) or inhibition (-) degrees of *Lactobacillus acidophilus* vital activity (ϵ_V ,%) at various incubation time in the presence of different plant extracts

C _{TE}	k	Тестируемые экстракты									
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 10
3	2	-61±9	-54±7	-71±9	-61±8	-70±9	-60±8	-63±9	-44±7	-51±7	-52±7
	4	-53±7	-45±7	-65±9	-55±8	-63±8	-56±8	-52±7	-39±6	-44±7	-44±6
	6	-41±7	-37±6	-50±7	-45±6	-57±9	-48±7	-47±7	-27±4	-42±6	-38±6
1,5	2	-19±3	-17±2	-22±3	-19±3	-23±3	-19±3	-20±3	-14±2	-15±2	-17±3
	4	-17±3	-14±2	-20±3	-17±3	-20±3	-18±3	-16±2	-12±2	-13±2	-15±2
	6	-13±2	-12±2	-16±2	-14±2	-18±3	-15±2	-15±2	-8±1	-12±2	-13±2
0,5	2	15±2	13±2	17±3	15±2	18±3	30±4	20±3	21±3	20±3	22±3
	4	-2±0,3	-2±0,3	5±1	4±0,7	11±2	3±0,5	2±0,3	1±0,2	7±1	8±1
	6	-7±1	-5±1	-9±1	-7±1	-10±2	-1±0,2	-7±1	-7±1	-7±1	-8±1
0,2	2	27±4	31±4	53±6	39±5	37±5	28±4	49±6	58±7	32±4	26±4
	4	19±3	25±4	34±5	35±5	42±6	22±4	41±6	43±6	28±4	19±3
	6	9±1	16±2	28±4	25±4	22±3	18±3	32±5	33±5	26±4	18±3

Примечание. C_{TE} – концентрация РЭ в тестовой среде, % об.; k – продолжительность инкубирования тестовой среды, ч. Тестируемые экстракты те же, что и в табл. 1.



Биологическая активность тестируемых экстрактов в отношении *L.acidophilus* при разных концентрациях ТЭ в тестовой среде, % об.: а – 3; б – 1,5; в – 0,5; д – 0,2.

Comparative biological activity of tested extracts (TE) against *L.acidophilus* at different TE concentrations in the test medium, % vol.: a – 3; b – 1.5; c – 0.5; d – 0.2

Из рисунка и табл. 2 видно, что с изменением концентрации ТЭ в тестовой среде довольно существенно может меняться и характер их биологической активности относительно других ТЭ. Причем особенно отчетливо это видно на примере концентраций ТЭ в тестовой среде (C_{TE}) меньших 1,5% об.

Также разную биологическую активность имели ТЭ, полученные из разных частей разных растений. Так, например, при $C_{TE} = 3\%$ об. пролонгированная антибиотическая активность (количественно характеризуемая в табл. 2 величиной $\epsilon_{V,6}$, определяемой через 6 ч инкубации тестовых микроорганизмов в присутствии ТЭ) экстракта, полученного из корней чистотела большого ($\epsilon_{V,6} = -57 \pm 9\%$, см. № 5 в табл. 2), с 95%-й достоверностью превышала активность экстрактов, полученных из побегов омеги белой и семян перца черного ($\epsilon_{V,6} = -27 \pm 4$ и $-38 \pm 6\%$ соответственно, см. экстракты № 8 и № 10 в табл. 2). В то же время при $C_{TE} = 0,2\%$ об. пробиотическая пролонгированная активность экстракта, полученного из побегов омеги белой ($\epsilon_{V,6} = 33 \pm 5\%$), с 95%-й достоверностью превышала активность экстрактов, полученных из корней чистотела большого и семян перца черного ($\epsilon_{V,6} = 22 \pm 3$ и $18 \pm 3\%$ соответственно). Последние в свою очередь с 95%-й достоверностью превышали пролонгированную пробиотическую активность экстракта, полученного из корней солодки голой ($\epsilon_{V,6} = 9 \pm 1\%$, см. № 1 в табл. 2).

В целом же среди исследованных экстрактов наиболее активные пролонгированные (долгострочные) антибиотические свойства в отношении тестовых микроорганизмов проявили экстракты из корней чистотела большого (№ 5) и цветков календулы лекарственной (№ 3) при $C_{TE} \geq 3\%$ об., в то время как наиболее активные пролонгированные пробиотические свойства проявили экстракты из побегов омеги белой (№ 8) и листьев грецкого ореха (№ 7) при $C_{TE} = 0,2\%$ об.

Краткосрочная (начальная) про- либо антибиотическая активность ТЭ (количественно характеризуемая в табл. 2 величиной $\epsilon_{V,2}$, определяемой через 2 ч инкубации тестовых биобъектов в присутствии ТЭ) в большинстве случаев была существенно больше их долгострочной активности (как уже говорилось, характеризуемой нами величиной $\epsilon_{V,6}$; см. табл. 2). Это объясняется, вероятно, как адаптацией тестовых биобъектов к присутствию ТЭ, так и уменьшением с течением времени активности и общего количества БАВ, содержащихся в ТЭ, приходящегося на один биобъект. Последнее является следствием того, что общее количество биобъектов во время инкубации содержащей их тестовой среды увеличивалось, в то время как активность и общее количество БАВ, содержащихся в ТЭ, в ходе инкубации содержащей их тестовой среды уменьшалось вследствие биохимической и физико-химической

денатурации и деструкции этих БАВ.

Среднесрочная (по времени взаимодействия ТЭ с тестовыми биобъектами) про- либо антибиотическая активность ТЭ (количественно характеризуемая в табл. 2 величиной $\epsilon_{V,4}$, определяемой через 4 ч инкубации тестовых сред с ТЭ) в большинстве случаев была промежуточной между $\epsilon_{V,2}$ и $\epsilon_{V,6}$ (см. табл. 2).

И наконец, с уменьшением концентрации ТЭ в тестовой среде их антибиотическая активность в отношении тестовых микроорганизмов монотонно уменьшалась, а пробиотическая активность, наоборот, увеличивалась. Так, например, при $C_{TE} = 3, 1,5$ и $0,2\%$ об. значения $\epsilon_{V,6}$ для экстракта из травы бессмертника песчаного были равны -45 ± 6 , -14 ± 2 и $25 \pm 4\%$ соответственно; а значения $\epsilon_{V,6}$ для экстракта из корней чистотела большого были равны -57 ± 9 , -18 ± 3 и $22 \pm 3\%$ соответственно (см. табл. 2 для экстрактов № 4 и № 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы убедились, что с помощью представленной в настоящей работе методики можно более экспрессно, объективно и информативно, чем при использовании стандартных визуальных методов микробиологического тестирования, оценивать влияние различных образцов фармацевтической, косметической, пищевой и другой продукции (такой, например, как растительные экстракты) на динамику жизненной активности разных микроорганизмов. Кроме того, представленная методика менее материало- и трудоемка, а также дает гораздо больше возможностей для автоматизации процесса анализа. При этом экспрессность представляемой методики достигается за счет ее большей чувствительности к начальным изменениям метаболической активности тестовых микроорганизмов в присутствии тестируемых образцов (обуславливаемой, в частности, заменой визуальных методов измерений на инструментальные). А более высокая объективность и информативность представляемой методики по сравнению со стандартными микробиологическими методами достигается за счет того, что эта методика дает возможность оценивать динамику изменения жизненной активности микроорганизмов на множестве произвольно выбираемых временных отрезков, в отличие от большинства ранее использовавшихся методик микробиологического тестирования, где измерения производятся лишь один раз в конце периода инкубации тестируемых образцов. Кроме того, представляемая методика предполагает оценку изменения жизненной активности микроорганизмов сразу по нескольким независимым показателям (таким как pH, редокс-потенциал и электропроводность тестовой среды с жизнеспособными микроорганизмами), а не только по одному (мутности тестовой среды, числу колоний микроорганизмов

или величине зоны задержки их роста), как в случае большинства ранее использовавшихся микробиологических методик.

Вышеперечисленное делает представленную методику доступной для более широкого применения, чем ранее используемые методы микробиологического тестирования. А это в свою очередь является весьма актуальным в свете того, что одним из важных условий обеспечения должного уровня безопасности и качества жизни людей является не только своевременное и качественное тестирование новой фармацевтической, пищевой и иной продукции, а также отдельных ингредиентов и добавок к ней (таких например, как различные растительные экстракты); но и постоянный широкий мониторинг про- и антибиотических свойств уже допущенной к массовому употреблению продукции с целью выявления недоброкачественных, либо успевших до окончательной реализации испортиться или претерпеть химическое или биологическое заражение ее образцов.

В отношении же собственно исследованных нами растительных экстрактов следует отметить следующее. Среди исследованных экстрактов наиболее активные пролонгированные антибиотические свойства проявили экстракты из корней чистотела большого и цветков календулы лекарственной при их концентрации в тестовой среде 3% об. и выше. Наиболее активные пролонгированные пробиотические свойства проявили экстракты из побегов омелы белой и листьев грецкого ореха при их концентрации в тестовой среде

0,2% об. (см. табл. 2).

Краткосрочная (начальная) про- и антибиотическая активность протестированных экстрактов в большинстве случаев была достоверно выше их долгосрочной (пролонгированной) активностью, в то время как среднесрочная (по времени взаимодействия тестированных экстрактов с тестовыми микроорганизмами) про- и антибиотическая активность тестированных экстрактов, как правило, была промежуточной по величине между их долгосрочной и краткосрочной активностью. При этом с уменьшением концентрации тестированных экстрактов в тестовой среде их антибиотическая активность монотонно и, как правило, достоверно уменьшалась, тогда как пробиотическая активность увеличивалась (см. табл. 2).

Таким образом, очевидно, что характер про- и антибиотической активности фармацевтической, пищевой и иной продукции, в том числе включающей различные растительные экстракты, в значительной мере определяется выбором не только сырья и способа экстрагирования из него биологически активных веществ, но и концентрацией экстракта в продукции, временем ее взаимодействия с микробиотой человека или иными живыми организмами и т.п. Причем точный характер этих зависимостей в большинстве случаев может быть установлен лишь с помощью значительного числа тестовых испытаний, которые удобно проводить с помощью представленной в данной работе методики.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Sutherland J., Miles M., Hedderley D., Li J., Devoy S., Sutton K., Lauren D. *In vitro* effects of food extracts on selected probiotic and pathogenic bacteria // International Journal of Food Sciences and Nutrition. 2009. Vol. 60. issue 8. P. 717–727. <https://doi.org/10.3109/09637480802165650>
2. Das S., Anjeza C., Mandal S. Synergistic or additive antimicrobial activities of *Indian spice* and herbal extracts against pathogenic, probiotic and food-spoiler microorganisms // International Food Research Journal. 2012. Vol. 19. Issue 3. P. 1185–1191.
3. Al-Zubairi A. S., Al-Mamary M. A., Al-Ghasani E. The antibacterial, antifungal and antioxidant activities of essential oil from different aromatic plants // Global Advanced Research Journal of Medicine and Medical Sciences. 2017. Vol. 6. Issue 9. P. 224–233.
4. Zhuravlev O.E., Voronchikhina L.I. Synthesis and antimicrobial activity of n-decylpyridinium salts with inorganic anions // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2018. Vol. 52. Issue 4. P. 312–315. <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1813-6>
5. Luzhnova S.A., Tyrkov A.G., Gabitova N.M., Yurtaeva E.A. Synthesis and antimicrobial activity of 5-(arylmethylidene)-2,4,6-pyrimidine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triones // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2018. Vol. 52. Issue 6. P. 506–509. <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1849-7>
6. Rodino S., Butu M. Herbal extracts – new trends in functional and medicinal beverages. In: Grumezescu A.M., Holban A.M. (ed.). *Functional and Medicinal Beverages*. Vol. 11: The Science of Beverages. Chapter 3. Academic Press. 2019. P. 73–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00003-0>
7. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review // International Journal of Food Microbiology. 2004. Vol. 94. Issue 3. P. 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
8. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idomar M. Biological effects of essential oils – a review // Food and Chemical Toxicology. 2008. Vol. 46. Issue 2. P. 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
9. Tripathi A.K., Bhojar P.K., Baheti J.R., Biyani D.M., Khalique M., Kothmire M.S., et al. Herbal anti-diabetics: a review // International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences. 2011. Vol. 2.

Issue 1. P. 30–37.

10. Fatima A., Alok S., Agarwal P., Singh P.P., Verma A. Benefits of herbal extracts in cosmetics: a review // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2013. Vol. 4. Issue 10. P. 3746–3760. [https://doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.4\(10\).3746-60](https://doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.4(10).3746-60)
11. Alok S., Jain S.K., Verma A., Kumar M., Mahor A., Sabharwal M. Herbal antioxidant in clinical practice: a review // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2014. Vol. 4. Issue 1. P. 78–84. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60213-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60213-6)
12. Radice M., Manfredini S., Ziosi P., Dissette V., Buso P., Fallacara A., et al. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review // Fitoterapia. 2016. Vol. 114. P. 144–162. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.003>
13. Merghni A., Marzouki H., Hentati H., Aouni M., Mastouri M. Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections // Current Research in Translational Medicine. 2016. Vol. 64. Issue 1. P. 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2015.10.003>
14. Fani M., Kohanteb J. *In vitro* antimicrobial activity of thymus vulgaris essential oil against major oral pathogens // Journal of Evidence-based Complementary & Alternative Medicine. 2017. Vol. 22. Issue 4. P. 660–666. <https://doi.org/10.1177/2156587217700772>
15. Kokina M.S., Frioui M., Shamtsyan M., Sibirtsev V.S., Krasnikova L.V., Konusova V.G., et al. Influence of pleurotus ostreatus β -glucans on the growth and activity of certain lactic acid bacteria // Scientific Study and Research: Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry. 2018. Vol. 19. Issue 4. P. 465–471.
16. Atarés L., Chiralt A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging // Trends in Food Science & Technology. 2016. Vol. 48. P. 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.001>
17. Ribeiro-Santos R., Andrade M., Melo N.R., Sanches-Silva A. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends // Trends in Food Science & Technology. 2017. Vol. 61. P. 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.021>
18. Ju J., Xie Y., Guo Y., Cheng Y., Qian H., Yao W. Application of edible coating with essential oil in food preservation // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2019. Vol. 59. Issue 15. P. 2467–2480. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1456402>
19. Yuan G.-F., Chen X., Li D. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems // Food Research International. 2016. Vol. 89. Part 1. P. 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.004>
20. Donsì F., Ferrari G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food // Journal of Biotechnology. 2016. Vol. 233. P. 106–120. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>
21. Pavela R., Benelli G. Essential Oils as Eco-friendly Biopesticides? Challenges and Constraints // Trends in Plant Science. 2016. Vol. 21. Issue 12. P. 1000–1007. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>
22. Rout P.K., Naik S.N., Rao Y.R. Subcritical CO₂ extraction of floral fragrance from *Quisqualis indica* // Journal of Supercritical Fluids. 2008. Vol. 45. Issue 2. P. 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.02.011>
23. Sahena F., Zaidul I.S.M., Jinap S., Karim A.A., Abbas K.A., Norulaini N.A.N., et al. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – a review // Journal of Food Engineering. 2009. Vol. 95. Issue 2. P. 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.026>
24. Ibadullaeva G.S., Pichkhadze G.M., Ustenova G.O., Dil'barkhanov R., Tikhonova S.A., Grud'ko V.A., et al. Chemical composition of the CO₂-extract of *Acorus Calamus* obtained under subcritical conditions // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2015. Vol. 49. Issue 6. P. 388–392. <https://doi.org/10.1007/s11094-015-1290-0>
25. Valle Jr.D.L., Cabrera E.C., Puzon J.J.M., Rivera W.L. Antimicrobial activities of methanol, ethanol and supercritical CO₂ extracts of Philippine *Piper betle* L. on clinical isolates of gram positive and gram negative bacteria with transferable multiple drug resistance // PLoS ONE. 2016. Vol. 11. Issue 1. Article e0146349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146349>
26. Lazarotto M., Valério A., Boligon A., Tres M.V., Scapinello J., Dal Magro J., et al. Chemical composition and antibacterial activity of bergamot peel oil from supercritical CO₂ and compressed propane extraction // Open Food Science Journal. 2018. Vol. 10. Issue 1. P. 16–23. <https://doi.org/10.2174/1874256401810010016>
27. Vieitez I., Maceiras L., Jachmanián I., Alborés S. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology // Journal of Supercritical Fluids. 2018. Vol. 133. P. 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.025>
28. Coelho J., Veiga J., Karmali A., Nicolai M., Pinto Reis C., Nobre B., et al. Supercritical CO₂ extracts and volatile oil of basil (*Ocimum basilicum* L.) comparison with conventional methods // Separations. 2018. Vol. 5. Issue 2. P. 21–33. <https://doi.org/10.3390/separations5020021>
29. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D. Spectral properties of bisbenzimidazole dyes upon interaction with DNA // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 1997. Vol. 23. Issue 12. P. 857–866.

30. Иванов С.Д., Коваленко А.Л., Кованько Е.Г., Ямшанов В.А., Акимов А.А., Забежинский М.А. [и др.]. Применение циклоферона при экспериментальной лучевой терапии опухолей // Вопросы онкологии. 1999. Т. 45. N 3. С. 292–297.

31. Sibirtsev V.S., Glibin E.N., Ivanov S.D. Variation of spectral properties of actinocin derivatives due to equilibrium transformations // Russian Journal of Organic Chemistry. 2000. Vol. 36. Issue 12. P. 1812–1818.

32. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D. Comparative study of DNA-specific dyes of the indole and benzimidazole series // Russian Journal of Organic Chemistry. 2001. Vol. 27. Issue 1. P. 54–73. <https://doi.org/10.1023/A:1009535320077>

33. Sibirtsev V.S., Tolmachev A.Yu., Suslov V.V., Garabadzhiu A.V., Traven' V.F. Dependence of fluorescence properties of compounds from psoralen, angelicin, and carbazole series on the character of their terminal substituents // Russian Journal of Organic Chemistry. 2003. Vol. 39. Issue 6. P. 881–889. <https://doi.org/10.1023/B:RUJO.0000003169.96393.1d>

34. Sibirtsev V.S. Study of applicability of the bifunctional system "Ethidium bromide + Hoechst-33258" for DNA analysis // Biochemistry (Moscow). 2005. Vol. 70. Issue 4. P. 449–457. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0136-x>

35. Sibirtsev V.S., Tolmachev A.Yu., Kovaleva M.V., Garabadzhiu A.V., Traven V.F. Spectral study of interactions of 4,8,4'-trimethylpsoralen and 4,4'-dimethylangelicin dyes with DNA // Biochemistry (Moscow). 2005. Vol. 70. Issue 7. P. 822–832. <http://doi.org/10.1007/s10541-005-0190-4>

36. Sibirtsev V.S. Fluorescent DNA probes: study of mechanisms of changes in spectral properties and features of practical application // Biochem-

istry (Moscow). 2007. Vol. 72. Issue 8. P. 887–900. <https://doi.org/10.1134/S0006297907080111>

37. Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V. Spectral study of the interaction of DNA with benzothiazolylbenzo-a-chromene // Biochemistry (Moscow). 2007. Vol. 72. Issue 8. P. 901–909. <https://doi.org/10.1134/S0006297907080123>

38. Sibirtsev V.S., Naumov I.A., Kuprina E.E., Olekhovich R.O. Use of impedance biotesting to assess the actions of pharmaceutical compounds on the growth of microorganisms // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2016. Vol. 50. Issue 7. P. 481–485. <https://doi.org/10.1007/s11094-016-1473-3>

39. Сибирцев В.С., Маслова А.Ю. Комплексное исследование динамики жизнедеятельности *E. coli* в присутствии ионов переходных металлов // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2019. Т. 19. N 2. С. 236–241. <https://doi.org/10.17586/2226-1494-2019-19-2-236-241>

40. Sibirtsev V.S., Uspenskaya M.V., Garabadzhiu A.V., Shvets V.I. An integrated method of instrumental microbiotesting of environmental safety of various products, wastes, and territories // Doklady Biological Sciences. 2019. Vol. 485. Issue 1. P. 59–61. <https://doi.org/10.1134/S001249661902011X>

41. Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В., Швец В.И. Новая методика комплексного фотофлуоресцентного микробиотестирования // Доклады Академии наук. 2019. Т. 489. N 6. С. 641–645. <https://doi.org/10.31857/S0869-56524896641-645>

42. Johnson K.J. Numerical methods in chemistry. New York: Taylor & Francis, 1980. 503 p.

43. Sibirtsev V.S. Analysis of benzo[a]pyrene deactivation mechanisms in rats // Biochemistry (Moscow). 2006. Vol. 71. Issue 1. P. 90–98. <https://doi.org/10.1134/S0006297906010147>

REFERENCES

1. Sutherland J, Miles M, Hedderley D, Li J, Devoy S, Sutton K, Lauren D. *In vitro* effects of food extracts on selected probiotic and pathogenic bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2009;60(8):717–727. <http://doi.org/10.3109/09637480802165650>

2. Das S, Anjeza C, Mandal S. Synergistic or additive antimicrobial activities of *Indian spice* and herbal extracts against pathogenic, probiotic and food-spoiler microorganisms. *International Food Research Journal*. 2012;19(3):1185–1191.

3. Al-Zubairi AS, Al-Mamary MA, Al-Ghasani E. The antibacterial, antifungal and antioxidant activities of essential oil from different aromatic plants. *Global Advanced Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2017;6(9):224–233.

4. Zhuravlev OE, Voronchikhina LI. Synthesis and antimicrobial activity of n-decylpyridinium salts with inorganic anions. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(4):312–315. <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1813-6>

5. Luzhnova SA, Tyrkov AG, Gabitova NM, Yurtaeva EA. Synthesis and antimicrobial activity of 5-(arylmethylidene)-2,4,6-pyrimidine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-triones. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018; 52(6):506–509. <https://doi.org/10.1007/s11094-018-1849-7>

6. Rodino S, Butu M. Herbal extracts – new trends in functional and medicinal beverages. In: Grumezescu AM, Holban AM. (eds.) *Functional and Medicinal Beverages*. Vol. 11: The Science of Beverages. Chapter 3. Academic Press; 2019. p. 73–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00003-0>

7. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;94(3):223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

8. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(2):446–

475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
9. Tripathi AK, Bhojar PK, Baheti JR, Biyani DM, Khalique M, Kothmire MS, et al. Herbal antidiabetics: a review. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2011;2(1):30–37.
10. Fatima A, Alok S, Agarwal P, Singh PP, Verma A. Benefits of herbal extracts in cosmetics: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2013;4(10):3746–3760. [https://doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.4\(10\).3746-60](https://doi.org/10.13040/ijpsr.0975-8232.4(10).3746-60)
11. Alok S, Jain SK, Verma A, Kumar M, Mahor A, Sabharwal M. Herbal antioxidant in clinical practice: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014;4(1):78–84. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60213-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60213-6)
12. Radice M, Manfredini S, Ziosi P, Dissette V, Buso P, Fallacara A, et al. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. *Fitoterapia*. 2016;114:144–162. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.003>
13. Merghni A, Marzouki H, Hentati H, Aouni M, Mastouri M. Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections. *Current Research in Translational Medicine*. 2016;64(1):29–34. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2015.10.003>
14. Fani M, Kohanteb J. *In vitro* antimicrobial activity of thymus vulgaris essential oil against major oral pathogens. *Journal of Evidence-based Complementary & Alternative Medicine*. 2017;22(4):660–666. <https://doi.org/10.1177/2156587217700772>
15. Kokina MS, Frioui M, Shamtsyan M, Sibirtsev VS, Krasnikova LV, Konusova VG, et al. Influence of pleurotus ostreatus beta-glucans on the growth and activity of certain lactic acid bacteria. *Scientific Study and Research: Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 2018;19(4):465–471.
16. Atarés L, Chiralt A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*. 2016;48:51–62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.001>
17. Ribeiro-Santos R, Andrade M, Melo NR, Sanches-Silva A. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology*. 2017;61:132–140. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.021>
18. Ju J, Xie Y, Guo Y, Cheng Y, Qian H, Yao W. Application of edible coating with essential oil in food preservation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019;59(15):2467–2480. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1456402>
19. Yuan G, Chen X, Li D. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. *Food Research International*. 2016; 89:117–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.004>
20. Donsì F, Ferrari G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*. 2016;233:106–120. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>
21. Pavela R, Benelli G. Essential Oils as Eco-friendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends in Plant Science*. 2016;21(12):1000–1007. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>
22. Rout PK, Naik SN, Rao YR. Subcritical CO₂ extraction of floral fragrance from *Quisqualis indica*. *Journal of Supercritical Fluids*. 2008;45(2):200–205. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.02.011>
23. Sahena F, Zaidul ISM, Jinap S, Karim AA, Abbas KA, Norulaini NAN, et al. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – a review. *Journal of Food Engineering*. 2009;95(2):240–253. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.026>
24. Ibadullaeva GS, Pichkhadze GM, Ustenova GO, Dil'barkhanov R, Tikhonova SA, Grud'ko VA, et al. Chemical composition of the CO₂-extract of *Acorus Calamus* obtained under subcritical conditions. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(6):388–392. <https://doi.org/10.1007/s11094-015-1290-0>
25. Valle JrDL, Cabrera EC, Puzon JJM, Rivera WL. Antimicrobial activities of methanol, ethanol and supercritical CO₂ extracts of Philippine *Piper betle* L. on clinical isolates of gram positive and gram negative bacteria with transferable multiple drug resistance. *PLoS ONE*. 2016;11(1). Article e0146349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146349>
26. Lazarotto M, Valério A, Boligon A, Tres MV, Scapinello J, Dal Magro J, et al. Chemical composition and antibacterial activity of bergamot peel oil from supercritical CO₂ and compressed propane extraction. *Open Food Science Journal*. 2018;10(1):16–23. <https://doi.org/10.2174/1874256401810010016>
27. Vieitez I, Maceiras L, Jachmanián I, Alborés S. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *Journal of Supercritical Fluids*. 2018;133:58–64. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.025>
28. Coelho J, Veiga J, Karmali A, Nicolai M, Pinto Reis C, Nobre B, et al. Supercritical CO₂ extracts and volatile oil of basil (*Ocimum basilicum* L.) comparison with conventional methods. *Separations*. 2018;5(2):21–33. <https://doi.org/10.3390/separations5020021>
29. Sibirtsev VS, Garabadzhiu AV, Ivanov SD. Spectral properties of bisbenzimidazole dyes upon interaction with DNA. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 1997;23(12):857–866.
30. Ivanov SD, Kovalenko AL, Kovan'ko EG, Jamschanov VA, Akimov AA, Zabezhinskii MA, et al. The use of cycloferon in experimental radiation therapy of tumors. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*. 1999;45(3):292–297. (In Russian)
31. Sibirtsev VS, Glibin EN, Ivanov SD. Variation of spectral properties of actinocin derivatives

due to equilibrium transformations. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2000;36(12):1812–1818.

32. Sibirtsev VS, Garabadzhiu AV, Ivanov SD. Comparative study of DNA-specific dyes of the indole and benzimidazole series. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2001;27(1):54–73. <https://doi.org/10.1023/A:1009535320077>

33. Sibirtsev VS, Tolmachev AYu, Suslov VV, Garabadzhiu AV, Traven' VF. Dependence of fluorescence properties of compounds from psoralen, angelicin, and carbazole series on the character of their terminal substituents. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2003;39(6):881–889. <https://doi.org/10.1023/B:RUJO.0000003169.96393.1d>

34. Sibirtsev VS. Study of applicability of the bifunctional system "Ethidium bromide + Hoechst-33258" for DNA analysis. *Biochemistry (Moscow)*. 2005;70(4):449–457. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0136-x>

35. Sibirtsev VS, Tolmachev AYu, Kovaleva MV, Garabadzhiu AV, Traven VF. Spectral study of interactions of 4,8,4'-trimethylpsoralen and 4,4'-dimethylangelicin dyes with DNA. *Biochemistry (Moscow)*. 2005;70(7):822–832. <http://doi.org/10.1007/s10541-005-0190-4>

36. Sibirtsev VS Fluorescent DNA probes: study of mechanisms of changes in spectral properties and features of practical application. *Biochemistry (Moscow)*. 2007;72(8):887–900. <https://doi.org/10.1134/S0006297907080111>

37. Sibirtsev VS, Garabadzhiu AV. Spectral study of the interaction of DNA with benzothiazolyl-benz-a-chromene. *Biochemistry (Moscow)*. 2007;

72(8):901–909. <https://doi.org/10.1134/S0006297907080123>

38. Sibirtsev VS, Naumov IA, Kuprina EE, Olekhovich RO. Use of impedance biotesting to assess the actions of pharmaceutical compounds on the growth of microorganisms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016;50(7):481–485. <https://doi.org/10.1007/s11094-016-1473-3>

39. Sibirtsev VS, Maslova AYu. Complex research of *E. coli* vital activity dynamics in presence of transition metal ions. *Nauchno-tekhnicheskii vestnik informacionnykh tekhnologii, me-khaniki i optiki = Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*. 2019;19(2):236–241. (In Russian) <https://doi.org/10.17586/2226-1494-2019-19-2-236-241>

40. Sibirtsev VS, Uspenskaya MV, Garabadzhiu AV, Shvets VI. An integrated method of instrumental microbiotesting of environmental safety of various products, wastes, and territories. *Doklady Biological Sciences*. 2019;485(1):59–61. <https://doi.org/10.1134/S001249661902011X>

41. Sibirtsev VS, Garabadzhiu AV, Shvets VI. New method of complex photo-fluorescent microbiotesting. *Doklady Akademii nauk*. 2019;489(6):196–199. (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S0012496619060103>

42. Johnson KJ. *Numerical methods in chemistry*. New York: Taylor & Francis; 1980. 503 p.

43. Sibirtsev VS. Analysis of benzo[a]pyrene deactivation mechanisms in rats. *Biochemistry (Moscow)*. 2006;71(1):90–98. <https://doi.org/10.1134/S0006297906010147>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Сибирцев Владимир Станиславович,
к.х.н., доцент, заведующий лабораторией
технологии переработки продуктов
биосинтеза,
ВНИИ пищевых добавок – филиал
Федерального научного центра пищевых
систем им. В.М. Горбатова РАН,
191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр-т, 55,
Российская Федерация,
✉ e-mail: vs1969r@mail.ru

Нечипоренко Ульяна Юрьевна,
младший научный сотрудник,
ВНИИ пищевых добавок – филиал
Федерального научного центра пищевых
систем им. В.М. Горбатова РАН,
191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр-т, 55,
Российская Федерация,
e-mail: unechiporenko@yandex.ru

Кабанов Владимир Леонидович,
младший научный сотрудник,
ВНИИ пищевых добавок – филиал
Федерального научного центра пищевых

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Vladimir S. Sibirtsev,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Head of the Laboratory of Technology
for Processing Biosynthesis Products,
All-Russia Research Institute for Food Additives –
branch of V.M. Gorbатов Federal Research
Center for Food Systems of RAS,
55, Liteiny Ave., St. Petersburg, 191014,
Russian Federation,
✉ e-mail: vs1969r@mail.ru

Ulyana Yu. Nechiporenko,
Junior Researcher,
All-Russia Research Institute for Food Additives –
Branch of V.M. Gorbатов Federal Research
Center for food systems of RAS,
55, Liteiny Ave., St. Petersburg, 191014,
e-mail: unechiporenko@yandex.ru

Vladimir L. Kabanov,
Junior Researcher,
All-Russia Research Institute for Food Additives –
Branch of V.M. Gorbатов Federal Research

систем им. В.М. Горбатова РАН,
191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр-т, 55,
Российская Федерация,
e-mail: kabanof_v@yahoo.com

Буханцев Олег Васильевич,
к.б.н., заместитель директора по инновациям,
ВНИИ пищевых добавок – филиал
Федерального научного центра пищевых
систем им. В.М. Горбатова РАН,
191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр-т, 55,
Российская Федерация,
e-mail: bukhantsev_ov@yandex.ru

Заявленный вклад авторов

Сибирцев В.С. – концепция исследования;
написание текста статьи; итоговые выводы;
Нечипоренко У.Ю. и Кабанов В.Л. – участие в
проведении экспериментов;
Буханцев О.В. – участие в сборе материалов
для исследования и обсуждении результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Статья поступила в редакцию 16.03.2020;
одобрена после рецензирования 30.09.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

Center for food systems of RAS,
55, Liteiny Ave., St. Petersburg, 191014,
e-mail: kabanof_v@yahoo.com

Oleg V. Bukhantsev,
Cand. Sci. (Biology),
Deputy Director for Innovation,
All-Russia Research Institute for Food Additives –
branch of V.M. Gorbato Federal Research
Center for Food Systems of RAS,
55, Liteiny Ave., St. Petersburg, 191014,
e-mail: bukhantsev_ov@yandex.ru

Contribution of the authors

Sibirtsev V.S. – research concept, writing the text
of the article final conclusions;
Nechiporenko U.Yu. and Kabanov V.L. – partici-
pation in experiments;
Bukhantsev O.V. – participation in the collection
of materials for research and discussion of the
results.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 16.03.2020;
approved after reviewing 30.09.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 633.584.6 : 661.68

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-603-612>



Сорбционные свойства кремнийсодержащих образцов по отношению к бактериям

© У.В. Харченко*, О.Д. Арефьева*, А.Е. Панасенко*, Л.А. Земнухова*,
И.А. Беленева**

*Институт химии ДВО РАН, г. Владивосток, Российская Федерация

**Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского
ДВО РАН, г. Владивосток, Российская Федерация

Резюме: Кремнийсодержащие аморфные вещества – диоксид кремния (кремнезем) и алюмосиликаты, имеют широкий спектр применения благодаря их пористости, химической инертности, термической стабильности. Традиционным сырьем для их получения являются кварц, диатомит, различные по составу силикаты. Однако методы выделения чистых соединений достаточно дороги и энергоемки. В качестве альтернативного сырья можно использовать возобновляемые и многотоннажные растительные отходы, содержащие большое количество кремния. К таковым относятся, например, шелуха и солома риса (*Oryza sativa*). Основным достоинством этого сырья являются невысокая стоимость, практически постоянный химический состав для одного вида растения, при этом методы переработки просты и не требуют больших финансовых затрат. Ввиду высокого содержания диоксида кремния в рисовой шелухе и соломе продукты их переработки являются эффективными адсорбентами многих типов поллютантов из водных растворов. В литературе имеются данные о взаимодействии разных микроорганизмов с синтетическими высокодисперсными материалами на основе диоксида кремния минерального происхождения, но практически отсутствуют сведения для биогенных форм кремнезема и алюмосиликатов, источником которых могут быть отходы производства риса. Ранее нами была установлена избирательная способность ряда кремнийсодержащих образцов, выделенных из рисовых отходов, в зависимости от сырья (шелуха или солома) и условий получения, связывать разные по природе бактерии на примере *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*. Целью настоящей работы являлось изучение сорбции образцами аморфного диоксида кремния и алюмосиликатов, полученными из шелухи и соломы риса, тестовых культур *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. Образцами сравнения служили коммерческие продукты: природный алюмосиликат – вспученный вермикулит и сорбент «Белый уголь», который содержит примерно равные доли кремнезема и микрокристаллической целлюлозы. Полученные результаты обсуждены в сопоставлении с физико-химическими параметрами веществ: составом, ИК-спектрами поглощения, характеристикой кислотно-основных свойств поверхности, полученной методами pH-метрии и адсорбции кислотно-основных индикаторов (метод Гаммета). Установлена зависимость сорбционной емкости сорбента по отношению к бактериям от исходного сырья, состава и метода получения.

Ключевые слова: рис, отходы, кремнезем, алюмосиликаты, микроорганизмы, сорбция

Для цитирования: Харченко У.В., Арефьева О.Д., Панасенко А.Е., Земнухова Л.А., Беленева И.А. Сорбционные свойства кремнийсодержащих образцов по отношению к бактериям. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 4. С. 603–612. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-603-612>

Sorption action of silicon-containing samples against bacteria

Uliana V. Kharchenko*, Olga D. Arefieva*, Aleksandr E. Panasenko*,
Liudmila A. Zemnukhova*, Irina A. Beleneva**

*Institute of Chemistry FEB RAS, Vladivostok, Russian Federation

**A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS,
Vladivostok, Russian Federation

Abstract: Silicon-containing amorphous substances, such as silicon dioxide (silica) and aluminosilicates, have a wide range of applications due to their porosity, chemical inertness and thermal stability. These materials are conventionally produced from quartz, diatomite and silicates of various compositions. However, the existing methods for isolating pure compounds are quite expensive and energy intensive. Renewable biological waste containing large amounts of silicon, e.g. rice husks and straw (*Oryza sativa*), can be used as an alternative raw material. The main advantages of such a material consist in its low cost, almost constant chemical composition, as well as simple and relatively inexpensive processing methods. Due to the high content of silicon dioxide in rice husks and straw, their recycling products are effective adsorbents of many types of pollutants from aqueous solutions. Although some publications describe interaction processes between microorganisms and highly-dispersive synthetic materials based on silicon dioxide of mineral origin, there is a lack of information on the biogenic forms of silica and aluminosilicates obtained from rice production wastes. In previous studies, we established the ability of a number of silicon-containing samples isolated from rice production wastes, depending on the raw material (husk or straw) and production conditions, to bind different bacteria, e.g. *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. In this work, we studied the sorption action of amorphous silicon dioxide and aluminosilicates obtained from rice husks and straw against the test cultures of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. The reference materials were such commercial products as expanded vermiculite (natural aluminosilicate) and the 'White Coal' sorbent containing approximately equal proportions of silica and microcrystalline cellulose. The obtained results were discussed in the context of the physicochemical parameters of the studied substances, including their chemical composition, IR absorption spectra, characteristics of the acid-base properties of the surface assessed by the methods of pH-metry and adsorption of acid-base indicators (Hammett's method). It was established that the sorption capacity of a sorbent in relation to bacteria depends on the initial material, its composition and production method.

Keywords: rice, waste, silica, aluminosilicates, microorganisms, sorption

For citation: Kharchenko UV, Arefieva OD, Panasenko AE, Zemnukhova LA, Beleneva IA. Sorption action of silicon-containing samples against bacteria. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):603–612. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-603-612>

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день существует большой выбор сорбентов, обладающих поглощающими свойствами по отношению к микроорганизмам в зависимости от задач, стоящих, например, в биотехнологии, при очистке водных сред или организма человека. В качестве активных компонентов такие сорбенты могут содержать вещества различной природы (органические, углеродные, кремнийсодержащие или комбинированные) и структуры, связывая токсины ионообменным, абсорбционным, адсорбционным или комплексообразовательным методом [1–3]. В данной работе рассмотрены материалы только на основе диоксида кремния и алюмосиликатов, имеющие широкий спектр применения, в том числе и в качестве сорбентов. Традиционным для их получения является минеральное сырье: кварцевые пески, каолиновые глины и горные породы [4–6], переработка которых требует больших финансовых затрат. Альтернативным возобновляемым источником кремния могут служить кремнефильные растения и, прежде всего, многотоннажные сельскохозяйственные отходы производства риса – солома (РС) и шелуха (РШ), содержащие в зависимости от сорта растения до 20% диоксида кремния [7–11]. Некоторые физико-химические свойства

аморфного кремнезема и алюмосиликатов, полученных из рисовых отходов, описаны в работах [12–14].

Преимуществами такого сырья является не только возможность утилизации пожароопасных отходов, но и довольно простые и дешевые способы его переработки, которые определены требованиями к составу и качеству конечных продуктов. В литературе недостаточно данных по адсорбции микроорганизмов кремнийсодержащими продуктами, полученными из рисовых отходов. Ранее в работе [15] была показана избирательная способность подобных образцов связывать микроорганизмы на примере *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*. В публикации [16] приведены сведения о взаимодействии микроорганизмов с синтетическими высокодисперсными материалами на основе диоксида кремния минерального происхождения. Целью настоящей работы являлось изучение сорбции бактерий *E. coli* и *B. subtilis* образцами аморфного диоксида кремния и алюмосиликатов, полученными из шелухи и соломы риса, в сравнении с коммерческими продуктами – вспученным вермикулитом и энтеросорбентом «Белый уголь». Выбор образцов сравнения обусловлен их схожестью по составу с крем-

нийсодержащими образцами из растительного сырья, а также их известными сорбционными свойствами [17–19].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. В таблице представлены следующие кремнийсодержащие образцы, методы их получения и элементный состав: аморфный диоксид кремния (1–3) и алюмосиликат натрия (4) получены из шелухи и соломы риса, отобранных в Федеральном научном центре агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки (п. Тимирязевский, Приморский край); вспученный вермикулит Кокшаровского месторождения (Кш) Приморского края (5) – коммерческий продукт [20]; образец, полученный обработкой соляной кислотой вермикулита Кш (6); продукт обработки вермикулита (Кш) растворами HCl, FeCl₃, FeCl₂ и щелочным гидролизатом РС (7) [21]; коммерческий сорбент «Белый уголь», производители ООО «Внешторг Фарма», Москва (8) и ООО «Омнифарма Киев» (9).

Инструментальные методы исследования. Анализ образцов проводили химическими и физико-химическими методами. Содержание кремния определяли весовым методом согласно ГОСТ 9428-73¹. Для установления элементного состава использовали атомно-абсорбционный спектрофотометр AA-780 (Shimadzu, Япония). ИК-спектры поглощения были записаны на Фурье-спектрометре Vertex 70 (Bruker, Германия) в области 400–4000 см⁻¹ в бромиде калия. Рентгеновские дифрактограммы записывали на дифрактометре D8 Advance (Bruker, Германия) в Си Kα-излучении. Идентификацию фаз проводили с использованием программы EVA по базе данных PDF-2.

Кислотно-основные свойства поверхности сорбентов изучали методами рН-метрии^{2,3}, позволяющими оценить интегральную кислотность поверхности образцов, и методу Гаммета, указывающему на распределение по поверхности кислотно-основных центров. Анализ поверхности образцов проводили методом адсорбции кислотно-основных индикаторов (метод Гаммета) с использованием 21 индикатора со значениями рK_a в интервале от -0,29 до +16,80. По полученным данным были построены кривые распределения центров адсорбции индикаторов на поверхности исследованных образцов, как и в работах [14, 22].

Сорбция микроорганизмов. Для исследования сорбционных характеристик в работе использовались тест-культуры микроорганизмов, хранящиеся в музее культур Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук: *E. coli* ATCC 15034, *B. subtilis* ВКМ В501. Штаммы культивировали на триптозно-соевом агаре (Caso-agar, Merck) в течение 24 ч при 28 °С. Колонии бактерий суспендировали в растворе 0,05 М NaCl для получения суспензии с оптической плотностью OD₆₇₀ = 0,300. Интенсивность адсорбции микроорганизмов образцами исследовали двумя методами: фильтрованием бактериальных суспензий через определенное количество порошка и стандартным методом изучения взаимодействия микроорганизмов с сорбентом путем их совместного культивирования. При использовании первого метода 0,5 см³ порошка помещали на фильтровальную бумагу и пропускали через него 10 см³ суспензии, содержащей 10⁸ кл/см³. Концентрацию клеток в суспензии после фильтрования оценивали спектрофотометрически и определяли по предварительно построенным градуировочным кривым. Процентное содержание адсорбированных клеток устанавливали по следующему уравнению:

$$I = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%,$$

где C_0 и C_1 – концентрация бактериальных клеток в суспензии до и после взаимодействия соответственно (кл/см³).

Для определения эффективности сорбции микроорганизмов сорбентами при использовании второго метода 1,0 см³ кремнийсодержащих образцов смешивали с 20 см³ бактериальной суспензии, содержащей 10⁸ кл/см³. Смесь перемешивали в течение 1 ч и затем центрифугировали при 4000 об./мин в течение 15 мин. Концентрацию клеток в суспензии после центрифугирования оценивали турбидиметрически, как описано выше.

Адсорбцию бактериальных клеток изучали в растворе NaCl (0,05 М) при рН = 7. Все полученные экспериментальные данные по адсорбции микроорганизмов представляют собой среднее значение трех независимых экспериментов в трех повторностях.

¹ГОСТ 9428-73. Кремний(IV) оксид. Технические условия. М.: Издательство стандартов, 1993. 12 с.

²Минакова Т.С. Адсорбционные процессы на поверхности твердых тел: учеб. пособие. Томск: Изд-во Томского ун-та, 2007. 283 с.

³Иконникова К.В., Иконникова Л.Ф., Минакова Т.С., Саркисов Ю.С. Теория и практика рН-метрического определения кислотно-основных свойств поверхности твердых тел: учеб. пособие. Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2011. 85 с.

Исследованные образцы сорбентов
 Studied sorbent samples

Номер образца	Сырье	Схема получения	Основной состав	Содержание, %						
				SiO ₂	Al ₂ O ₃	Na ₂ O	K ₂ O	CaO	MgO	Fe ₂ O ₃
1		Схема 1: окислительный обжиг РШ при t=650 °С [13].	SiO ₂ + nC	92,5	0,03	0,05	н/д**	0,71	0,55	0,1
2	РШ	Схема 2: окислительный обжиг с предварительной обработкой РШ 0,1 М раствором соляной кислоты [13].	SiO ₂	99,5	0,05	0,07	н/д	0,03	0,01	0,05
3		Схема 3: гидролиз РШ 1 М раствором NaOH с последующим осаждением кремнезема концентрированным раствором HCl до pH 5-6 [13].	SiO ₂ ·nH ₂ O	88,5	0,15	0,80	н/д	0,18	0,02	0,04
4	РС	Гидролиз РС 1 М раствором NaOH с последующим осаждением алюминосиликата насыщенным раствором Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O [14].	Na ₄ Al ₃ Si ₁₇ O ₃₆ ·nH ₂ O	49,0	38,0	11,5	1,6	0,17	н/о	0,31
5	Кш*	Вспученный вермикулит [20].	(Mg, Fe, Al) ₂ (Al, Si) ₁₀ (OH) ₂ ·4H ₂ O	32,1	18,2	0,2	5,5	2,0	19,6	22,5
6	Кш*-HCl	Образец Кш суспендировали в 12,5% растворе HCl в течение 2 суток. Твердый остаток отфильтровывали, промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции и сушили на воздухе [21].	(Mg, Ca) ₂ AlSi ₁₀ O ₂₄ ·nH ₂ O	89,3	3,6	н/о***	н/о	1,0	6,7	0,3
7	Кш*, РС	Навеску Кш суспендировали в 12,5% растворе HCl в течение 2 суток, твердый остаток отфильтровывали и промывали дистиллированной водой, добавили раствор FeCl ₃ и FeCl ₂ в мольном соотношении 2:1 из расчета 3,5 г железа на 100 г вермикулита. Образовавшийся кислый раствор нейтрализовали щелочным гидролизатом РС до нейтральной реакции. Выпавший осадок отделили фильтрованием, промыли водой, высушили при температуре 105 °С, измельчили до размера частиц 0,25 мм.	(Na, K) ₄ Mg ₁₁ Al ₃ Si ₇ O ₂₉ / Fe ₃ O ₄	39,4	10,4	21,6	н/о	0,20	26,6	2,0
8	Белый уголь	Производитель ООО «Внешторг Фарма», Москва.	SiO ₂ + A****	31,1	0,25	0,33	0,06	н/о	0,93	0,08
9		Производитель ООО «Омнифарма, Киев».		33,2			н/д			0,07

Примечание.

*Кш – вспученный вермикулит Кошаровского месторождения (Приморский край), ГОСТ 12865-67 [20], фракция 0,1–0,25 мм; **н/д – нет данных; ***н/о – элемент не определен; ****А – наполнители в сорбенте «Белый уголь». Производитель: дioxид кремния аморфный (фирмы Degussa) – 210 мг; микрокристаллическая целлюлоза – 208 мг; наполнитель декстроза – 157 мг; разрыхлитель кроссарамеллоза натрия – 97 мг; антислеживающие агенты: тальк фармокопейный – 21 мг; стеарат магния – 7 мг; № 9, Киев: диоксид кремния – 210 мг; микрокристаллическая целлюлоза; вспомогательные вещества: сахарная пудра, крахмал картофельный.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Элементный состав и строение образцов.

Согласно данным рентгенофазового анализа, образцы 1–4, 6 и 7 находятся в аморфном состоянии, образец 5 – в кристаллическом [20], а 8 – в аморфно-кристаллическом (идентифицируются две фазы кремнезема: тридимит и коэсит). На рис. 1 показаны рентгенограммы образцов 2 и 5. Содержание кремния в образцах в пересчете на SiO_2 (см. таблицу) варьирует в диапазоне ~32–99%. Сорбент «Белый уголь» (образец 8) содержит примерно равные доли диоксида кремния и микрокристаллической целлюлозы, а также другие наполнители (декстрозу, кроскармеллозу натрия, тальк и стеарат магния).

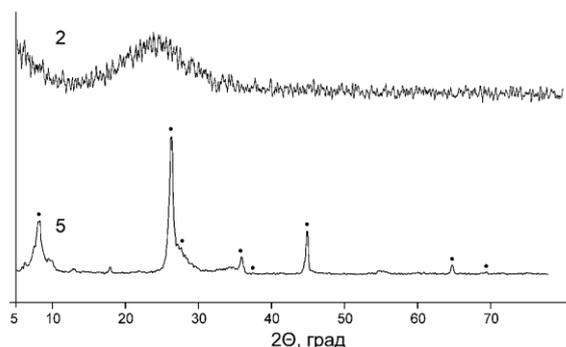


Рис. 1. Рентгенограммы кремнийсодержащих образцов из растительного и минерального сырья (номер линии соответствует номеру образца по таблице)

Fig. 1. X-ray diffraction patterns of silicon-containing samples from plant and mineral raw materials (line number corresponds to the sample number according to Table)

Образцы 1–5, как показано ранее в [13, 20, 22], относятся к мезопористым сорбентам с диаметром пор 3,0–19,0 нм. Наибольшей однородностью пор характеризуются образцы кремнезема из РШ [23]. Значения величины удельной поверхности ($S_{уд.}$) для кремнийсодержащих образцов 1–4 значительно различаются между собой: наибольшие значения $S_{уд.}$ имеют образцы 2, 3, полученные из рисовой шелухи (231 и 479 $\text{m}^2/\text{г}$ соответственно) [13], термический кремнезем (образец 1) – 62 $\text{m}^2/\text{г}$, для образца 4, выделенного из соломы риса, эта величина равна 69 $\text{m}^2/\text{г}$ [22], а для вермикулита (образец 5) – 8,9 $\text{m}^2/\text{г}$ [20].

ИК спектры поглощения образцов 1–3 описаны в работах [12, 13], образцов 4 и 5 – в [14, 20]. Все они характеризуются наличием полос поглощения в области ~ 467, 800 и 1095–1101 cm^{-1} , соответствующим валентным и деформационным колебаниям силоксановых связей Si-O-Si, имеющих в аморфном диоксиде кремния (образцы 1–3). В образце 3 наблюдается также полоса при ~ 958 cm^{-1} , свидетельствующая о силанольных связях Si-OH в этом веществе. В спектре образца 4 полоса валентных асимметричных силоксановых связей проявляется в области ~1010 cm^{-1} , что специфично для алюмосиликатов. На присутствие в образце воды указывают полосы поглощения ва-

лентных (~3400 cm^{-1}) и деформационных (~1640 cm^{-1}) связей O-H. На рис. 2 показаны ИК-спектры образцов 2–4 и 8.

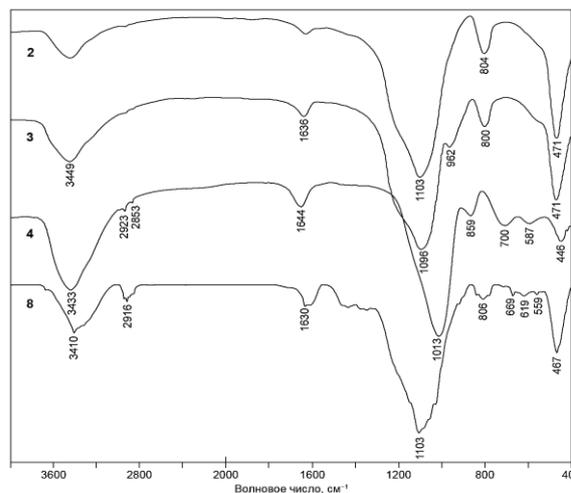


Рис. 2. ИК-спектры поглощения кремнийсодержащих образцов из растительного и минерального сырья (номер линии соответствует номеру образца по таблице)

Fig. 2. IR absorption spectra of silicon-containing samples from plant and mineral raw materials (line number corresponds to the sample number according to Table)

Кислотно-основные свойства поверхности.

Кривые изменения pH водных суспензий образцов аморфного диоксида кремния (1–3) и алюмосиликатов (4, 5) представлены на рис. 3 в сравнении с дистиллированной водой. Значение pH водных суспензий образцов 1–3 (рис. 3, а) изменяется в зависимости от схемы получения кремнезема: от щелочного 10,0 (3) и 8,9 (1) до слабокислого 6,4 (2). Отметим, что в статье [15] были приведены значения дзета-потенциала для образцов аморфного кремнезема из РШ, аналогичные образцам 1–3 в данном исследовании, которые характеризовались отрицательным значением в диапазоне от -9,63 до -42,2 мВ в зависимости от схемы получения образца. Щелочную среду (pH = 9,4) имеет также водная суспензия алюмосиликата натрия (образец 4), полученного из РС, в то время как суспензия вермикулита (образец 5) показывает слабокислую среду (pH = 6,3) (рис. 3, б).

На рис. 4 показаны кривые распределения центров адсорбции индикаторов, найденные методом Гаммета, на поверхности образцов диоксида кремния (1–3) и алюмосиликатов (4, 5). Поверхность образцов 1–3 характеризуется наличием следующих активных центров: льюисовские кислотные ($\text{pK}_a + 16,8$), бренстедовские основные ($\text{pK}_a + 10,0$; 7,15) и слабокислотные ($\text{pK}_a + 6,4$) центры (рис. 4, а). Особенностью образца 3, полученного в щелочной среде, является большее количество анионных гидроксидов, обладающих бренстедовской основностью при $\text{pK}_a + 7,15$; +10,0. Количество слабокислотных бренстедовских центров в образцах 1–3 изменяется от 3,5 (образец 2) до $10,7 \cdot 10^{-2}$ (образец 1) ммоль/г.

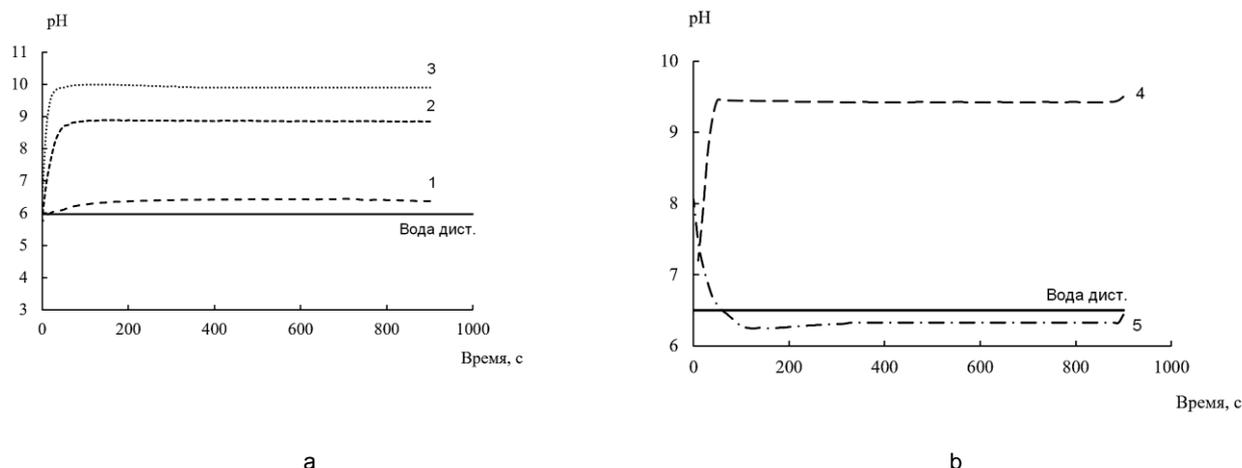


Рис. 3. Значение pH водной суспензии кремнийсодержащих образцов из растительного и минерального сырья (номер образца по таблице)

Fig. 3. pH of aqueous suspension of silicon-containing samples from plant and mineral raw materials (number according to Table)

В спектре распределения центров адсорбции алюмосиликата (рис. 4, *b*), полученного из РС (образец 4), присутствуют основные 4 полосы, описывающие следующие активные центры: бренстедовские кислотные ($pK_a +2,5$ и $3,46$), слабокислотные ($pK_a +6,4$), основные ($pK_a +9,45$) и льюисовские кислотные ($pK_a +16,8$). Отличительной особенностью поверхности образца 4 является присутствие большого количества кислот Бренстеда при $pK_a 2,5$ и $3,46$, образующихся при взаимодействии с водой и обусловленных Si-OH-группами. Природный вермикулит (образец 6) имеет те же центры, но в значительно меньшем количестве.

Сорбция микроорганизмов. Эффективность сорбции бактерий *E. coli* и *B. subtilis* кремнийсодержащими образцами (см. табл. 1) показана на рис. 5. Как свидетельствуют данные, все исследованные образцы сорбируют более 50% бактерий кишечной группы *E. coli*. Сорбционная способность образцов аморфного кремнезема, полученных из РШ по разным схемам (образцы 1–3),

составляет от 66 до 77%, при этом образцы 1 и 2 оказались более эффективным в отношении *E. coli* в сравнении с образцом 8 (различия достоверны, *t*-критерий составляет 0,001 при $p \leq 0,05$).

Из группы алюмосиликатов (образцы 4–7) наибольшая сорбционная эффективность по отношению к бактериям *E. coli* обнаружена у образца 4, полученного из соломы риса, составляющая 82%, наименьшая (58%) – у природного алюмосиликата вермикулита, обработанного соляной кислотой (образец 6). Гибридный сорбент (образец 7) связывает указанные бактерии выше (76%), чем вспученный вермикулит (образец 5 – 70%), и сравним с образцом 2 (*t*-критерий = 0,003 при $p \leq 0,05$).

Таким образом, исследованные образцы по отношению к сорбции грамотрицательных бактерий *E. coli* можно расположить в следующий ряд по поглотительной способности: $4 > 2, 7 > 1 > 5, 8 > 3 > 6 > 9$.

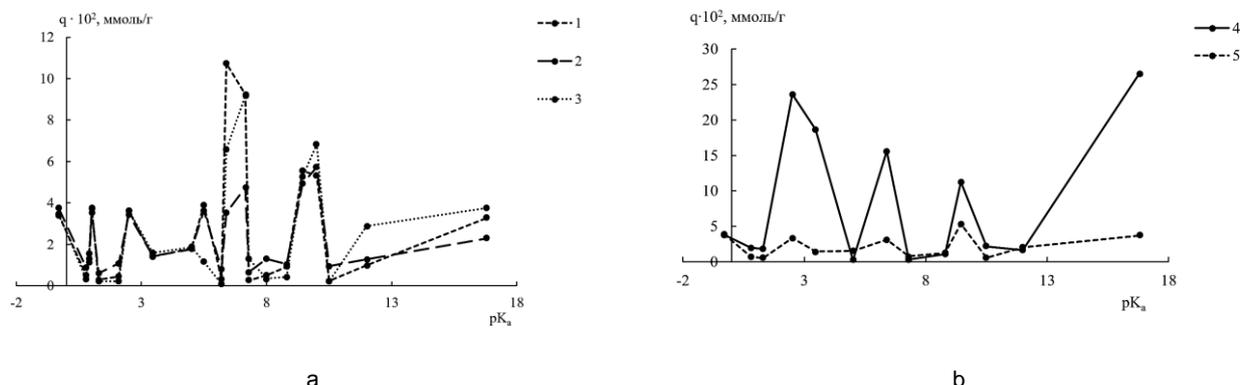


Рис. 4. Кислотно-основные центры Гаммета на поверхности кремнийсодержащих образцов из растительного и минерального сырья (номер по таблице)

Fig. 4. Acid-basic Hammett centers on the surface of silicon-containing samples from plant and mineral raw materials (number according to Table)

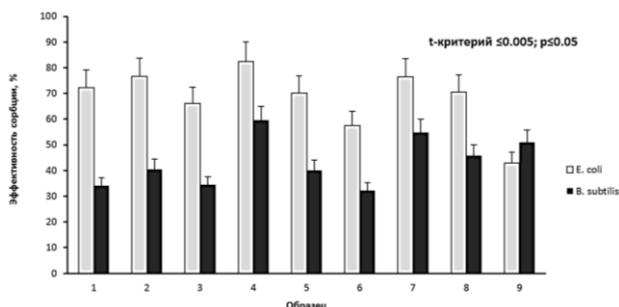


Рис. 5. Эффективность сорбции *E. coli* и *B. subtilis* кремнийсодержащими образцами из растительного и минерального сырья (номер – по таблице)

Fig. 5. Sorption efficiency of *E. coli* and *B. subtilis* by silicon-containing samples from plant and mineral raw materials (number – according to Table)

Сопоставление данного ряда с характеристикой поверхности образцов показывает следующее:

1) pH водной суспензии образца не влияет на связывание данных бактерий (образцы 3 и 4 имеют близкие значения pH) (см. рис. 3);

2) существует взаимосвязь между сорбцией бактерий и большим количеством сильноокислотных бренстедовских центров (pK_a 2,5) и льюисовских кислотных центров (pK_a 16,8) в образце 4 (см. рис. 4);

3) процесс сорбции бактерий в алюмосиликатах (образцы 4, 6, 7) и аморфных кремнеземах (образцы 1–3), вероятно, также связан с элементным составом: разным содержанием в них одновалентных (натрия и/или калия) и трехвалентных (алюминия, железа) металлов.

Эффективность сорбции грамположительных бактерий *B. subtilis* исследованными образцами заметно меньше, чем бактерий *E. coli* (см. рис. 5) и составляет для диоксида кремния из РШ (образцы 1–3) 34–40%, для алюмосиликата из РС (образец 4) – 59%, а для «Белого угля» (образец 8) – 46%. Вермикулит (образец 5) сорбирует 40% этих бактерий, что заметно ниже сорбционной способности гибридного образца 7, который сорбирует 54%. Ряд эффективности сорбции образцов по отношению к бактериям *B. subtilis* можно

представить следующим: 4>7, 9>8>2, 5>1, 3, 6, где место образцов 4, 7, 5, 8 и 6 сопоставимо с указанным выше рядом.

Сопоставление данного ряда с характеристикой поверхности образцов показывает следующее:

1) pH водной суспензии образца также не влияет на связывание данных бактерий (см. рис. 3);

2) возможно, что основное влияние на сорбцию бактерий *B. subtilis* оказывает наличие на поверхности образцов сильноосновных центров Бренстеда при pK_a 9,45, которых больше всего в образце 4.

Сравнительный анализ сорбционной эффективности коммерческих продуктов «Белый уголь» показал, что у образца 8 эффективность сорбции по отношению к кишечной палочке *E. coli* выше ($70,5 \pm 6,7\%$), чем у образца 9 ($43,0 \pm 4,1\%$). При этом по отношению к бактериям *B. subtilis* сорбционная способность обоих образцов примерно одинакова – $51,0 \pm 4,7$ и $45,8 \pm 4,2\%$ соответственно. Возможно, это связано с характеристикой используемого разными производителями кремнезема и наполнителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование показало, что все кремнийсодержащие образцы, полученные из РШ, РС и на основе природного вермикулита, проявляют сорбционную активность по отношению к бактериям штаммов *E. coli* и *B. subtilis*. Наиболее перспективными в качестве сорбентов *E. coli* являются: образец диоксида кремния (2), полученный по схеме 2 из обработанной соляной кислотой РШ; алюмосиликат натрия (4), полученный из РС; вспученный вермикулит Кокшаровского месторождения (5) с размером частиц 0,1–0,25 мм, который сравним по эффективности с коммерческим сорбентом «Белый уголь»; гибридный сорбент (7).

Эффективность сорбции данных образцов по отношению к бактериям *B. subtilis* меньше, наиболее активными являются образцы 4 и 7 в сравнении с «Белым углем».

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Singh N.B., Nagpal G., Agrawal S., Rachna. Water purification by using adsorbents: A review // Environmental Technology and Innovation. 2018. Vol. 11. P. 187–240. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.05.006>
2. Bhatnagar A., Sillanpää M. Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment – A review // Chemical Engineering Journal. 2010. Vol. 157. Issue 2-3. P. 277–296. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.01.007>
3. De Gisi S., Lofrano G., Grassi M., Notarnicola M. Characteristics and adsorption capacities of low-cost sorbents for wastewater treatment: A Review //

Sustainable Materials and Technologies. 2016. Vol. 9. P. 10–40. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2016.06.002>

4. Khatsrinov A.I., Mezhevich Z.V., Kornilov A.V., Lygina T.Z. Inorganic sorbents based on modified natural calcium- and iron-containing aluminosilicates // Inorganic Materials. 2019. Vol. 55. Issue 11. P. 1138–1145. <https://doi.org/10.1134/S0020168519110062>

5. Fonseca D., Barba F., Callejas P., Recio P. Application of clay minerals from Cayo Guan, Cuba, as sorbents of heavy metals and ceramic raw materials // Boletín de la Sociedad Española de Cerami-

са у Vidrio. 2012. Vol. 51. Issue 5. P. 261–268. <https://doi.org/10.3989/cyv.372012>

6. Li X., Li B., Xu J., Wang Q., Pang X., Gao X., et al. Synthesis and characterization of Ln-ZSM-5/MCM-41 (Ln = La, Ce) by using kaolin as raw material // *Applied Clay Science*. 2010. Vol. 50. Issue 1. P. 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.07.006>

7. Ahmaruzzaman M., Gupta V.K. Rice husk and its ash as low-cost adsorbents in water and wastewater treatment // *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2011. Vol. 50. Issue 24. P. 13589–13613. <https://doi.org/10.1021/ie201477c>

8. Della V.P., Kuhn I., Hotza D. Rice husk ash as an alternate source for active silica production // *Materials Letters*. 2002. Vol. 57. Issue 4. P. 818–821. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(02\)00879-0](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(02)00879-0)

9. Chuah T.G., Jumariah A., Azni I., Katayon S., Choong S.Y.T. Rice husk as a potentially low-cost biosorbent for heavy metal and dye removal: an overview // *Desalination*. 2005. Vol. 175. Issue 3. P. 305–316. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2004.10.014>

10. Kim M., Yoon S.H., Choi E., Gil B. Comparison of the adsorbent performance between rice hull ash and rice hull silica gel according to their structural differences // *LWT – Food Science and Technology*. 2008. Vol. 41. Issue 4. P. 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.04.006>

11. Dai Y., Sun Q., Wang W., Lu L., Liu M., Li J., et al. Utilizations of agricultural waste as adsorbent for the removal of contaminants: A review // *Chemosphere*. 2018. Vol. 211. P. 235–253. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.179>

12. Zemnukhova L.A., Fedorishcheva G.A., Egorov A.G., Sergienko V.I. Recovery conditions, impurity composition, and characteristics of amorphous silicon dioxide from wastes formed in rice production // *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2005. Vol. 78. Issue 2. P. 319–323. <https://doi.org/10.1007/s11167-005-0283-2>

13. Zemnukhova L.A., Panasenko A.E., Fedorishcheva G.A., Maiorov V.Y., Tsoi E.A., Shapkin N.P., et al. Composition and structure of amorphous silica produced from rice husk and straw // *Inorganic Materials*. 2014. Vol. 50. Issue 1. P. 75–81. <https://doi.org/10.1134/S0020168514010208>

14. Панасенко А.Е., Борисова П.Д., Арефьева О.Д., Земнухова Л.А. Алюмосиликаты из соломы

риса: получение и сорбционные свойства // *Химия растительного сырья*. 2019. N 3. С. 291–298. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2019034278>

15. Zemnukhova L., Kharchenko U., Beleneva I. Biomass derived silica containing products for removal of microorganisms from water // *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2014. Issue 12. P. 1495–1502. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0529-8>

16. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / под ред. А.А. Чуйко. Киев: Наукова думка, 2003. 415 с.

17. Лейкин Ю.А., Черкасова Т.А., Смагина Н.А. Вермикулитовый сорбент для очистки воды от нефтяных углеводородов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2009. Т. 9. N 1. С. 104–117.

18. Хальченко И.Г., Шапкин Н.П., Свистунова И.В., Токарь Э.А. Химическая модификация вермикулита и исследование его физико-химических свойств // *Бутлеровские сообщения*. 2015. Т. 41. N 1. С. 74–82.

19. Конорев М.Р. Клиническая фармакология энтеросорбентов нового поколения // *Вестник фармации*. 2013. N 4 (62). С. 79–85.

20. Земнухова Л.А., Панасенко А.Е., Полякова Н.В., Курявый В.Г., Арефьева О.Д., Земнухов В.А. Вермикулит Кокшаровского месторождения (Приморский край) и его свойства // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2018. Т. 26. N 1. С. 19–26. <https://doi.org/10.15372/KhUR20180104>

21. Shapkin N.P., Khal'chenko I.G., Panasenko A.E., Leont'ev L.B., Razov V.I. Hybrid composite materials based on natural layered silicates // *Inorganic Materials*. 2018. Vol. 54. Issue 9. P. 965–969. <https://doi.org/10.1134/S0020168518090145>

22. Arefieva O.D., Pirogovskaya P.D., Panasenko A.E., Zemnukhova L.A. Acid-base properties of aluminosilicates from rice husk and straw // *SN Applied Sciences*. 2020. Vol. 2. Art. 894. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2732-1>

23. Zemnukhova L.A., Babushkina T.A., Klimova T.P., Ziatdinov A.M., Kholomeyidik A.N. Structural features of amorphous silica from plants // *Applied Magnetic Resonance*. 2012. Vol. 42. Issue 4. P. 577–584. <https://doi.org/10.1007/s00723-012-0332-y>

REFERENCES

1. Singh NB, Nagpal G, Agrawal S, Rachna. Water purification by using adsorbents: A review. *Environmental Technology and Innovation*. 2018;11: 187–240. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.05.006>

2. Bhatnagar A, Sillanpää M. Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment – A review. *Chemical Engineering Journal*. 2010;157(2-3):277–296. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.01.007>

3. De Gisi S, Lofrano G, Grassi M, Notarnicola M. Characteristics and adsorption capacities of low-

cost sorbents for wastewater treatment: A Review. *Sustainable Materials and Technologies*. 2016;9:10–40. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2016.06.002>

4. Khatsrinov AI, Mezhevich ZV, Kornilov AV, Lygina TZ. Inorganic sorbents based on modified natural calcium- and iron-containing aluminosilicates. *Inorganic Materials*. 2019;55(11):1138–1145. <https://doi.org/10.1134/S0020168519110062>

5. Fonseca D, Barba F, Callejas P, Recio P. Application of clay minerals from Cayo Guan, Cuba, as

sorbents of heavy metals and ceramic raw materials. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 2012;51(5):261–268. <https://doi.org/10.3989/cyv.372012>

6. Li X, Li B, Xu J, Wang Q, Pang X, Gao X, et al. Synthesis and characterization of Ln-ZSM-5/MCM-41 (Ln = La, Ce) by using kaolin as raw material. *Applied Clay Science*. 2010;50(1):81–86. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.07.006>

7. Ahmaruzzaman M, Gupta VK. Rice husk and its ash as low-cost adsorbents in water and wastewater treatment. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2011;50(24):13589–13613. <https://doi.org/10.1021/ie201477c>

8. Della VP, Kuhn I, Hotza D. Rice husk ash as an alternate source for active silica production. *Materials Letters*. 2002;57(4):818–821. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(02\)00879-0](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(02)00879-0)

9. Chuah TG, Jumariah A, Azni I, Katayon S, Choong SYT. Rice husk as a potentially low-cost biosorbent for heavy metal and dye removal: an overview. *Desalination*. 2005;175(3):305–316. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2004.10.014>

10. Kim M, Yoon SH, Choi E, Gil B. Comparison of the adsorbent performance between rice hull ash and rice hull silica gel according to their structural differences. *LWT – Food Science and Technology*. 2008;41(4):701–706. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.04.006>

11. Dai Y, Sun Q, Wang W, Lu L, Liu M, Li J, et al. Utilizations of agricultural waste as adsorbent for the removal of contaminants: A review. *Chemosphere*. 2018;211:235–253. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.179>

12. Zemnukhova LA, Fedorishcheva GA, Egorov AG, Sergienko VI. Recovery conditions, impurity composition, and characteristics of amorphous silicon dioxide from wastes formed in rice production. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2005;78(2):319–323. <https://doi.org/10.1007/s11167-005-0283-2>

13. Zemnukhova LA, Panasenko AE, Fedorishcheva GA, Maiorov VY, Tsoi EA, Shapkin NP, et al. Composition and structure of amorphous silica produced from rice husk and straw. *Inorganic Materials*. 2014;50(1):75–81. <https://doi.org/10.1134/S0020168514010208>

14. Panasenko AE, Borisova PD, Arefieva OD, Zemnukhova LA. Aluminosilicates from rice straw:

obtaining and sorption properties. *Khimija rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*. 2019;3:291–298. (In Russian) <https://doi.org/10.14258/jcprm.2019034278>

15. Zemnukhova L, Kharchenko U, Beleneva I. Biomass derived silica containing products for removal of microorganisms from water. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2014;12:1495–1502. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0529-8>

16. Chuiko AA. (ed.) *Medical chemistry and clinical application of silicon dioxide*. Kiev: Naukova dumka; 2003. 415 p. (In Russian)

17. Leykin YA, Cherkasova TA, Smagina NA. Vermiculite sorbent for water cleaning from oil hydrocarbons. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protssessy = Sorption and Chromatography Processes*. 2009;9(1):104–117 (In Russian)

18. Khalchenko IG, Shapkin NP, Svistunova IV, Tokar EA. Physical and chemical properties of the modified vermiculite. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2015;41(1):74–82 (In Russian)

19. Konorev MR. Clinical pharmacology of enterosorbents of new generation. *Vestnik farmatsii*. 2013;4:79–85. (In Russian)

20. Zemnukhova LA, Panasenko AE, Polyakova NV, Kuravii VG, Arefieva OD, Zemnukhov VA. Vermiculite from the Koksharovskiy deposit (Primorsky krai) and its properties. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya = Chemistry for Sustainable Development*. 2018;26(1):19–26. (In Russian) <https://doi.org/10.15372/KhUR20180104>

21. Shapkin NP, Khalchenko IG, Panasenko AE, Leont'ev LB, Razov VI. Hybrid composite materials based on natural layered silicates. *Inorganic Materials*. 2018;54(9):965–969. <https://doi.org/10.1134/S0020168518090145>

22. Arefieva OD, Pirogovskaya PD, Panasenko AE, Zemnukhova LA. Acid-base properties of aluminosilicates from rice husk and straw. *SN Applied Sciences*. 2020;2. Art. 894. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2732-1>

23. Zemnukhova LA, Babushkina TA, Klimova TP, Ziatdinov AM, Kholomeydyk AN. Structural features of amorphous silica from plants. *Applied Magnetic Resonance*. 2012;42(4):577–584. <https://doi.org/10.1007/s00723-012-0332-y>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Харченко Ульяна Валерьевна,
к.х.н., научный сотрудник лаборатории
защитных материалов и морской коррозии,
Институт химии ДВО РАН,
690022, г. Владивосток,
пр-т 100-летия Владивостока, 159,
Российская Федерация,
e-mail: ulyana-kchar@mail.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Uliana V. Kharchenko,
Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
Laboratory of Protective Materials
and Marine Corrosion,
Institute of Chemistry FEB RAS,
159, 100-letiya Vladivostoka St.,
Vladivostok, 690022,
Russian Federation,
e-mail: ulyana-kchar@mail.ru

Арефьева Ольга Дмитриевна,
к.пед.н., доцент, научный сотрудник
лаборатории химии редких металлов,
Институт химии ДВО РАН,
690022, г. Владивосток,
пр-т 100-летия Владивостока, 159,
Российская Федерация,
✉ e-mail: arefeva.od@dvfu.ru

Панасенко Александр Евгеньевич,
к.х.н., старший научный сотрудник,
заведующий лабораторией химии редких
металлов,
Институт химии ДВО РАН,
690022, г. Владивосток,
пр-т 100-летия Владивостока, 159,
Российская Федерация,
e-mail: panasenko@ich.dvo.ru

Земнухова Людмила Алексеевна,
д.х.н., профессор, главный научный сотрудник
лаборатории химии редких металлов,
Институт химии ДВО РАН,
690022, г. Владивосток,
пр-т 100-летия Владивостока, 159,
Российская Федерация,
e-mail: zemnukhova@ich.dvo.ru

Беленева Ирина Алексеевна,
к.б.н., старший научный сотрудник
лаборатории морской микробиоты,
Национальный научный центр морской
биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
690041, г. Владивосток,
ул. Пальчевского 17,
Российская Федерация,
e-mail: beleneva.vl@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Статья поступила в редакцию 16.06.2020;
одобрена после рецензирования 01.10.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

Olga D. Arefieva,
Cand. Sci. (Pedagogics), Associate Professor,
Researcher,
Laboratory of Chemistry of Rare Metals,
Institute of Chemistry FEB RAS,
159, 100-letiya Vladivostoka St.,
Vladivostok, 690022,
Russian Federation,
✉ e-mail: arefeva.od@dvfu.ru

Aleksandr E. Panasenko
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
Chief of Laboratory of Chemistry of Rare Metals,
Institute of Chemistry FEB RAS,
159, 100-letiya Vladivostoka St.,
Vladivostok, 690022,
Russian Federation,
e-mail: panasenko@ich.dvo.ru

Liudmila A. Zemnukhova,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Chief Researcher,
Laboratory of Chemistry of Rare Metals,
Institute of Chemistry FEB RAS,
159, 100-letiya Vladivostoka St.,
Vladivostok, 690022,
Russian Federation,
e-mail: zemnukhova@ich.dvo.ru

Irina A. Beleneva,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Laboratory of Marine Microbiota,
A.V. Zhirmunsky National Scientific Center
of Marine Biology FEB RAS,
17, Palchevsky St., Vladivostok, 690041,
Russian Federation,
e-mail: beleneva.vl@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 16.06.2020;
approved after reviewing 01.10.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 664.8 + 634.11

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-613-626>



Исследование потенциальных антиканцерогенных и антиоксидантных эффектов экстрактов из растительного сырья

© Н.Б. Еремеева, Н.В. Макарова,
Д.Ф. Игнатова, В.В. Бахарев

Самарский государственный технический университет,
г. Самара, Российская Федерация

Резюме: Одним из основных этиологических факторов возникновения некоторых видов злокачественных опухолей является наличие в организме хронических воспалительных процессов. В ряде медицинских исследований для противовоспалительных лекарственных средств показан антиканцерогенный эффект относительно рака толстого кишечника. Кроме того, имеются данные о взаимосвязи антиканцерогенной и антиоксидантной активностей некоторых биологически активных веществ, присутствующих в лекарственных растениях. В настоящей работе исследованы потенциальные антиканцерогенные эффекты экстрактов, полученных из растительного сырья: брусники (*Vaccinium vitis-idaea*), малины (*Rubus idaeus*), черноплодной рябины (*Aronia melanocarpa*), семян винограда (*Vitis L.*), выжимок винограда (*Vitis L.*), зеленого Краснодарского чая (*Camellia sinensis*), женьшеня (*Panax L.*), иван-чая (*Chamaenerion angustifolium*) и кофе (*Coffea arabica*). Оценено влияние данных экстрактов на рост и жизнеспособность клеток рака толстого кишечника линии HCT-116 *in vitro* с помощью МТТ-теста, а также влияние нетоксических доз экстрактов на базальный и индуцированный уровень экспрессии провоспалительных генов: циклооксигеназы (COX2); индуцируемой NO-синтазы (iNOS); интерлейкина 8 (IL8), методом количественной полимеразной цепной реакции. Определены рабочие концентрации исследуемых экстрактов для клеток HCT-116. Продемонстрировано, что все исследуемые экстракты способны снижать экспрессию провоспалительных генов COX-2, iNOS и IL-8. Наиболее выраженным суммарным ингибирующим действием на экспрессию данных генов обладают экстракты черноплодной рябины и иван-чая. Данные экстракты рекомендуется использовать в дальнейших исследованиях влияния на индуцированную экспрессию генов COX-2, iNOS и IL-8, а также в исследованиях антиканцерогенной активности *in vivo*. Антиоксидантная активность определена по методу DPPH и FRAP. Наибольшие значения по данным методикам показали экстракты черноплодной рябины, малины и иван-чая. Выявлена зависимость антиканцерогенной и антиоксидантной активностей.

Ключевые слова: воспаление, антиоксидантная активность, растительные экстракты, COX2, iNOS, IL-8, МТТ-тест, количественная полимеразная цепная реакция

Благодарности: Работа выполнена в рамках государственного задания на проведение фундаментальных исследований № 0778-2020-0005.

Для цитирования: Еремеева Н.Б., Макарова Н.В., Игнатова Д.Ф., Бахарев В.В. Исследование потенциальных антиканцерогенных и антиоксидантных эффектов экстрактов из растительного сырья. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 4. С. 613–626. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-613-626>

Study of potential anti-carcinogenic and antioxidant effects of plant extracts

Natalya B. Eremeeva, Nadezhda V. Makarova,
Dinara F. Ignatova, Vladimir V. Bakharev

Samara State Technical University,
Samara, Russian Federation,

Abstract: One of the main etiological factors in the development of some malignant tumours is the presence of chronic inflammatory processes. A number of biomedical studies have confirmed the anticarcinogenic effect of anti-inflammatory drugs with respect to colon cancers. In addition, some biologically active substances present in medicinal plants have been found to exhibit both anti-carcinogenic and antioxidant activity. In this paper, we investigate potential anticarcinogenic effects of extracts obtained from plant raw materials, including lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*), raspberry (*Rubus idaeus*), black chokeberry (*Aronia melanocarpa*), grape seeds (*Vitis L.*), grape pomace (*Vitis L.*), Krasnodar green tea (*Camellia sinensis*), ginseng (*Panax L.*), fireweed (*Chamaenerion angustifolium*) and coffee (*Coffea arabica*). The effect of these extracts on the growth and viability of colon HCT-116 cancer cells was assessed *in vitro* using the method of MTT assay. In addition, the effect of non-toxic doses of the extracts under study on the basal and induced levels of pro-inflammatory gene expression – cyclooxygenase (COX2), inducible NO synthase (iNOS) and interleukin 8 (IL8) – was assessed by quantitative PCR. The working concentrations of the extracts under study for HCT-116 cells were determined. It is demonstrated that all investigated extracts are capable of suppressing the expression of COX-2, iNOS and IL-8. Black chokeberry and fireweed extracts exhibit the most pronounced total inhibitory effect on the expression of these inflammatory genes. Future research should investigate effects of black chokeberry and fireweed extracts on the induced expression of COX-2, iNOS and IL-8 and their anti-carcinogenic activity *in vivo*. The antioxidant activity determined using DPPH and FRAP was the highest for black chokeberry, raspberry and fireweed. A relationship between the anticarcinogenic and antioxidant effects of the extracts under study was revealed.

Keywords: inflammation, antioxidant activity, plant extracts, COX2, iNOS, IL-8, MTT assay, qPCR

Acknowledgments: The research was carried out within the framework of the state assignment for fundamental research No. 0778-2020-0005.

For citation: Eremeeva NB, Makarova NV, Ignatov DF, Bakharev VV. Study of potential anti-carcinogenic and antioxidant effects of plant extracts. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):613–626. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-613-626>

ВВЕДЕНИЕ

Профилактика раковых заболеваний является наиболее рентабельной и долгосрочной стратегией борьбы с данным заболеванием. В настоящее время хорошо известно, что почти 50% всех случаев возникновения злокачественных опухолей у взрослых можно предотвратить, ведя здоровый образ жизни, предусматривающий употребление натуральных продуктов с профилактическим действием против рака [1]. В качестве химиопрофилактиков эти продукты представляют особый интерес ввиду их потенциально низкой токсичности и потенциально высокой эффективности [2, 3]. Так, например, описаны случаи, когда употребление зеленого чая может снизить риск возникновения рака верхних отделов желудочно-кишечного тракта, рака легких, гепатоцеллюлярного рака и рака молочной железы у женщин в менопаузе [4].

Полифенолы представляют собой одну из самых больших разновидностей растительных компонентов с несколькими тысячами отдельных типов соединений. Типичными полифенолами являются фенолсодержащие соединения с остовами углеродного скелета в диапазоне от C1-C6 до C3-C6 и C6-C3-C6 [5]. Именно у класса полифенолов выявлено наличие антиканцерогенного эффекта.

При химиопрофилактике рака применяют четыре основных механизма: модулирование наследственных признаков или изменений в экспрессии генов, которые вызваны воздействием

канцерогенов и которые могут активировать процесс канцерогенеза; противодействие эффектам обостряющих факторов (таких, например, как стресс), которые способствуют развитию раковых клеток; противодействие выживанию раковых клеток посредством модуляции клеточных механизмов; ограничение способности раковых клеток к метастазированию. Эффекты, вызываемые полифенолами, довольно многогранны, причем наиболее освещены механизмы, связанные со стимуляцией апоптоза [6] и аутофагии [7], регуляцией клеточных сигнальных каскадов [8, 9], эпигенетической модуляцией (метилирование ДНК или посттрансляционные модификации гистонов) [10, 11], а также ингибированием пролиферации раковых клеток, их ангиогенеза и метастазирования [12, 13]. Полифенолы используют антиоксидантные и противовоспалительные свойства для ингибирования канцерогенеза [14, 15], тем самым предотвращая или задерживая прогрессирование и клиническое проявление рака.

Одним из основных этиологических факторов возникновения некоторых видов рака является хроническое воспаление. Таким образом, некоторые противовоспалительные лекарственные средства (например, нестероидный противовоспалительный препарат Ибупрофен) обладают антиканцерогенным эффектом относительно раковых клеток толстой кишки.

За последние годы значительно возрос интерес к поиску систем с антиканцерогенным, анти-

мутагенным, антипролиферативным действием среди пищевых продуктов, пищевого сырья и пищевых полуфабрикатов. Так, среди наиболее интересных объектов можно выделить: по пищевым продуктам – вино [16], красные томаты [17]; по пищевому сырью – бобы [18], растительное сырье [19]; по пищевым полуфабрикатам – антоциановый комплекс из темной кислой вишни [20].

При этом в ряде исследований используется контроль биологической активности исследуемых объектов. Так, например, это может быть доксорубин [16], эллиптицин [17]. В других экспериментах применяется негативный контроль, например, для семян вигны [21]. Но в ряде работ внимание сосредоточено на сравнении нескольких пищевых объектов между собой, другие объекты не включаются, например, при исследовании фруктов и вина из черной смородины [22], растительного сырья (орегано, шиповник, семена крушины) [19].

В частности, на клеточной линии рака толстого кишечника методом ОТ-ПЦР было исследовано влияние нетоксических доз экстрактов на экспрессию генов: (1) циклооксигеназы 2 (COX-2); (2) индуцируемой NO-синтазы (*iNOS*); (3) интерлейкина 8 (*IL-8*) [23].

Функциональная активность гена COX-2 напрямую связана с воспалением. Этот ген экспрессируется макрофагами, синовиоцитами, фибробластами, гладкой сосудистой мускулатурой, хондроцитами и эндотелиальными клетками после индуцирования их цитокинами или факторами роста. Простагландины, образующиеся под действием COX-2, напрямую или опосредованно усиливают продукцию самого фермента по механизму положительной обратной связи [24]. Ингибирование COX-2 рассматривается как один из основных механизмов противовоспалительной активности нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), так как при селективном ингибировании данной циклооксигеназы можно минимизировать многие побочные симптомы, наблюдаемые при ингибировании циклооксигеназы 1. COX-2 играет важную роль в развитии воспалительных процессов и канцерогенеза в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). Повышенную экспрессию COX-2 наблюдали в 85% злокачественных опухолей ЖКТ, что также коррелировало с низкой выживаемостью. На моделях у животных было показано, что делеция COX-2 или обработка животных селективными ингибиторами COX-2 уменьшает число опухолей, их размер и множественность. COX-2 способствует прогрессии опухоли за счет индукции экспрессии антиапоптотических белков семейства *Bcl-2*, что в дальнейшем приводит к резистентности к апоптозу [23].

IL-8 известен как хемотаксический фактор Т-клеток и фактор, активирующий нейтрофилы (NAF) [25, 26]. Он относится к группе хемокинов,

основное свойство которых заключается в обеспечении хемотаксиса в зону воспаления различных типов клеток: нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, Т-клеток. *IL-8* обладает выраженными провоспалительными свойствами, вызывая экспрессию молекул межклеточной адгезии и усиливая прилипание нейтрофилов к эндотелиальным клеткам и субэндотелиальным матричным белкам, что свидетельствует о его основной роли в опосредовании воспалительного ответа [27]. Клетками-продуцентами *IL-8* являются макрофаги, лимфоциты, эпителиальные клетки, фибробласты, клетки эпидермиса. Была также продемонстрирована роль *IL-8* в регуляции провоспалительного ангиогенеза: данный цитокин усиливает экспрессию фактора роста сосудов А (VEGF-A) эндотелиальными клетками и повышает экспрессию рецептора 2 фактора роста сосудов (VEGFR2) [28].

iNOS регулируется на уровне экспрессии провоспалительными цитокинами (фактор роста опухоли α (TNF- α), интерлейкин-1 β (IL-1 β), интерферон- γ (IFN- γ), гипоксией, окислительным стрессом и, как было недавно показано, белком теплового шока Hsp70 [29]. Ингибирование *iNOS* является результатом подавления активности провоспалительных и про-пролиферативных сигнальных путей NF- κ B и JAK-STAT [30].

По результатам оценки экспрессии данных генов можно сделать вывод о наличии/отсутствии противовоспалительной активности экстрактов для клеток толстой кишки. Предлагаемое исследование не является изучением антиканцерогенных свойств молекул, но может служить основанием для проведения экспериментов *in vivo* по определению антиканцерогенной активности.

В последнее время увеличилось количество работ, где описана связь между антиканцерогенной и антиоксидантной активностями. Так, в работе [31] показано, что в листьях и стеблях *Gastrocotyle hispida* (гастрокотиле шершавый) имеется высокое содержание β -ситостерина и его производных, которые проявляют антиоксидантное действие по методам DPPH и ABTS, а также показали значительную активность против клеток рака печени, почек и молочной железы. Ученым канадского университета удалось выделить и очистить фукоидан из морских бурых водорослей *Sargassum polycystum*, а затем проанализировать его на антиоксидантную и антиканцерогенную активности [32]. Была выявлена прямая зависимость антиоксидантной активности по методу DPPH и жизнеспособности раковых клеток MCF-7 и HCT-15 от концентрации фукоидана. Установлено антиоксидантное и противомутагенное действие метанольных экстрактов, выделенных из листьев *Annona muricata* (анноны колючей – «сметанное яблоко») [33].

Целью представленной работы было исследовать

дование потенциальных антиканцерогенных эффектов экстрактов, полученных из растительного сырья. Были оценены: 1) влияние данных экстрактов на рост и жизнеспособность клеток рака толстого кишечника линии HCT-116 *in vitro* с помощью МТТ-теста (3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтеразол); 2) влияние нетоксических доз экстрактов на базальный уровень экспрессии провоспалительных генов: (1) циклооксигеназы (COX-2); (2) индуцируемой NO-синтазы (iNOS); (3) интерлейкина 8 (IL8), методом количественного ПЦР-анализа (полимеразной цепной реакции); 3) антирадикальная активность по методу DPPH и восстанавливающая сила по методу FRAP; 4) зависимость антиканцерогенной и антиоксидантной активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. В качестве объектов исследования выбраны растительные экстракты, полученные из сырья: **1** – брусника (*Vaccinium vitis-idaea*); **2** – малина (*Rubus idaeus*); **3** – черноплодная рябина (*Aronia melanocarpa*); **4** – семена винограда (*Vitis L.*); **5** – выжимки винограда (*Vitis L.*); **6** – зеленый Краснодарский чай (*Camellia sinensis*); **7** – женьшень (*Panax L.*); **8** – иван-чай (*Chamaenerion angustifolium*); **9** – кофе (*Coffea arabica*).

Технология получения экстрактов. Все экстракты были получены экстрагированием 70%-м этиловым спиртом при ультразвуковом излучении в течение 90 мин с частотой 35 кГц и температуре 40±5 °С. Соотношение сырья и растворителя 1:10. Концентрирование происходило на циркуляционном вакуум-выпарном аппарате до содержания растворимых сухих веществ 65%.

Клеточная линия. В работе использовали линию клеток рака толстого кишечника HCT-116 [34]. Клетки культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 5%-ную эмбриональную сыворотку телят («РАА», Австрия) и гентамицин (50 ед./мл) («Ранесо», Россия) при 37 °С и в 5%-м растворе CO₂.

Исследование жизнеспособности клеток (МТТ-тест). Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты («BDMicro-FinePlus», США) (3·10³ клеток в 190 мкл культуральной среды) и инкубировали 24 ч. В день экспериментов приготавливали серийные разведения исследуемых растительных экстрактов. Клетки инкубировали с экстрактами в течение 72 ч в концентрациях от 0,03125 до 2% об., затем вносили 20 мкл раствора реагента МТТ (5 мг/мл, ПанЭко, Россия) в солевом растворе Хэнкса (ПанЭко, Россия) и инкубировали 2 ч при 37 °С до развития фиолетовой окраски.

ки. Образовавшийся формазан растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, ПанЭко, Россия), инкубировали при 37 °С. После полного растворения кристаллов формазана измеряли оптическую плотность содержимого лунок на мультилуночном спектрофотометре MultiScan MCC 340 (Labsystems, США) при длине волны 570 нм. Данные представляли в виде оптической плотности экспериментальных образцов относительно контроля. За 100% принимали оптическую плотность в контроле, где клетки инкубировали в присутствии 1%-го раствора этанола.

Клетки инкубировали с экстрактами в течение 72 ч в концентрациях от 0,03125 до 2% об. Затем вносили 20 мкл раствора реагента МТТ (5 мг/мл, ПанЭко, Россия) в солевом растворе Хэнкса (ПанЭко, Россия) и инкубировали 2 ч при 37 °С до развития фиолетовой окраски. Образовавшийся формазан растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, ПанЭко, Россия), инкубировали при 37 °С. После полного растворения кристаллов формазана измеряли оптическую плотность содержимого лунок на мультилуночном спектрофотометре MultiScan MCC 340 (Labsystems, США) при длине волны 570 нм. Данные представляли в виде оптической плотности экспериментальных образцов относительно контроля. За 100% принимали оптическую плотность в контроле, где клетки инкубировали в присутствии 1%-го раствора этанола.

По результатам МТТ-теста исследуемых экстрактов на цитотоксичность в широком диапазоне концентраций (0,031–2% об.) показано, что они обладают цитотоксическим эффектом на клетки рака толстого кишечника HCT-116 (табл. 1).

Клетки инкубировали с полуфабрикатом в течение 72 ч в концентрациях 0,03125–2% об., затем вносили 20 мкл раствора реагента МТТ (5 мг/мл) в солевом растворе Хэнкса (ПанЭко) и инкубировали 2 ч при 37 °С до развития фиолетовой окраски. Образовавшийся формазан растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО), инкубировали при 37 °С. После полного растворения кристаллов формазана измеряли оптическую плотность содержимого лунок на мультилуночном спектрофотометре при длине волны 570 нм. Данные представлены в виде оптической плотности экспериментальных образцов относительно контроля. За 100% принимали оптическую плотность в контроле, где клетки инкубировали в отсутствие соединения, но в присутствии растворителя (1% этанола).

Далее были использованы нетоксичные концентрации экстрактов и выбраны рабочие концентрации для исследования влияния экстрактов на уровень экспрессии генов COX-2, iNOS и IL-8.

Таблица 1. Влияние экстрактов на жизнеспособность клеток HCT-116
Table 1. Effect of extracts on the viability of HCT-116 cells

Объемная концентрация, %	0,25±0,05	0,165±0,01	0,09±0,03
Жизнеспособность клеток	IC50	IC30	IC10

Количественный ПЦР-анализ экспрессии генов *COX-2*, *iNOS* и *IL-8* проводили после предварительного культивирования клеток НСТ-116 в течение 24 ч с исследуемыми экстрактами в указанных в табл. 2 рабочих концентрациях. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *Rpl27*.

Выделение РНК. Выделение тотальной клеточной РНК проводили с помощью набора для выделения РНК RNeasy kit. Концентрацию РНК определяли по оптической плотности раствора, измеренной на спектрофотометре при длине волны 260 нм. Об отсутствии примесей в образце судили по соотношению значений оптической плотности раствора при длине волны 260 и 280 нм.

Реакция обратной транскрипции. После выделения РНК для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции. Для этого 1 мкг РНК смешивали с 0,4 мкг случайных гексамерных олигонуклеотидов, денатурировали при 25 °С и охлаждали на льду. В смесь для обратной транскрипции входили: 2 ед. обратной транскриптазы MMLV, соответствующий буфер, 2 мМ дитиотрейтола, 0,5 ед. ингибитора рибонуклеаз, 0,5 мМ дНТФ, и дистиллированная вода до 20 мкл. Реакцию проводили при 37 °С в течение 1 ч, затем останавливали реакцию инаktivацией обратной транскриптазы при 95 °С в течение 5 мин, добавляли 80 мкл дистиллированной воды и использовали аликвоты для проведения ПЦР-амплификации в реальном времени со специфическими праймерами.

Количественный ПЦР-анализ в реальном времени. Рабочие разведения кДНК после реакции обратной транскрипции были получены путем разведения образцов 1:10 стерильной деионизированной водой. 5 мкл рабочего раствора кДНК добавляли к 20 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green Master Mix, по 500 нМ прямого и обратного праймеров. Количественный ПЦР-анализ в режиме реального времени проводили с использованием ПЦР-анализатора Bio-Rad iQ5. Программа амплификации была следующей: 95 °С – 10 мин, 40 циклов (95 °С – 15 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с). Относительное изменение экспрессии исследуемой мРНК вычисляли методом $\Delta\Delta Ct$, где $\Delta\Delta Ct$ определяли путем вычитания среднего ΔCt контроля из ΔCt экспериментальных образцов [35]. Для каждого гена интереса ПЦР-анализ был проведен в трех повторах, а также были получены кривые плавления для каждой пары праймеров для подтверждения специфичности. Анализ кривых плавления проводили при увеличении температуры с 55 до 95 °С с шагом 0,5 °С. В качестве контроля использовали ген рибосомального белка *L27* (*Rpl27*).

Праймеры для амплификации кДНК были сконструированы с помощью базы данных Primer-

Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) и пакета программ Oligo 6. Последовательности праймеров указаны в табл. 1.

DPPH-метод. Метод определения радикалу-держивающей способности с использованием реактива 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила проводили следующим образом. В пробирки помещали 0,20 см³ экстракта концентрацией 0,1 мг/см³, 2,00 см³ дистиллированной воды, 2,00 см³ спиртового раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила. В контрольную пробу по экстракту помещали вместо раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила дистиллированную воду. В контрольную пробу по раствору 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила приливали вместо экстракта дистиллированную воду. Смесь выдерживали в течение 30 мин в недоступном для света месте. Колориметрию свободных радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила проводили спектрофотометрическим методом на приборе КФК-2-01-3ОМЗ при длине волны 517 нм в кювете толщиной слоя жидкости 10 мм. В кювету сравнения помещали этиловый спирт. Для данного исследования использовали экстракты 1–9 концентрацией 0,005; 0,05; 0,10; 0,25 и 0,50 г/см³.

Таблица 2. Последовательность используемых праймеров

Table 2. Sequence of primers used

Ген	Последовательность (прямая/обратная), 5'-3'
<i>RPL27</i>	ACC GCT ACC CCC GCA AAG TG CCC GTC GGG CCT TGC GTT TA
<i>COX2</i>	CCGGGTACAATCGCACTTAT GGCGCTCAGCCATACAG
<i>iNOS</i>	CGGCCATCACCGTGTTC CCC TGCAGTCGAGTGGTGGTCCA
<i>IL-8</i>	TCCTGATTTCTGCAGCTCTGTG TCCAGACAGAGCTCTCTCCAT

FRAP-метод (метод определения железосвязывающей активности экстрактов). Подготавливали реактив FRAP: в колбу помещали 10,00 см³ ацетатного буфера, pH= 3,6, 1,00 см³ 20 мМ раствора хлорида железа (III), 1,00 см³ реагента 2,4,6-три-(2-пиридил)-1,3,5-триазина (TPTZ). Смесь выдерживали в термостате в течение 10 мин при температуре 37 °С при периодическом перемешивании. В пробирки прибавляли 1,00 см³ реактива FRAP, 3,00 см³ дистиллированной воды, 0,10 готовых экстрактов 1–9 концентрацией 0,1 мг/см³. В контрольную пробу приливали вместо экстракта 0,10 см³ дистиллированной воды. Смесь выдерживают 4 мин при температуре 37 °С при периодическом перемешивании. Определение железосвязывающей активности проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 593 нм в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм. В кювету сравнения приливали дистиллированную воду. Определение железосвязывающей активности прово-

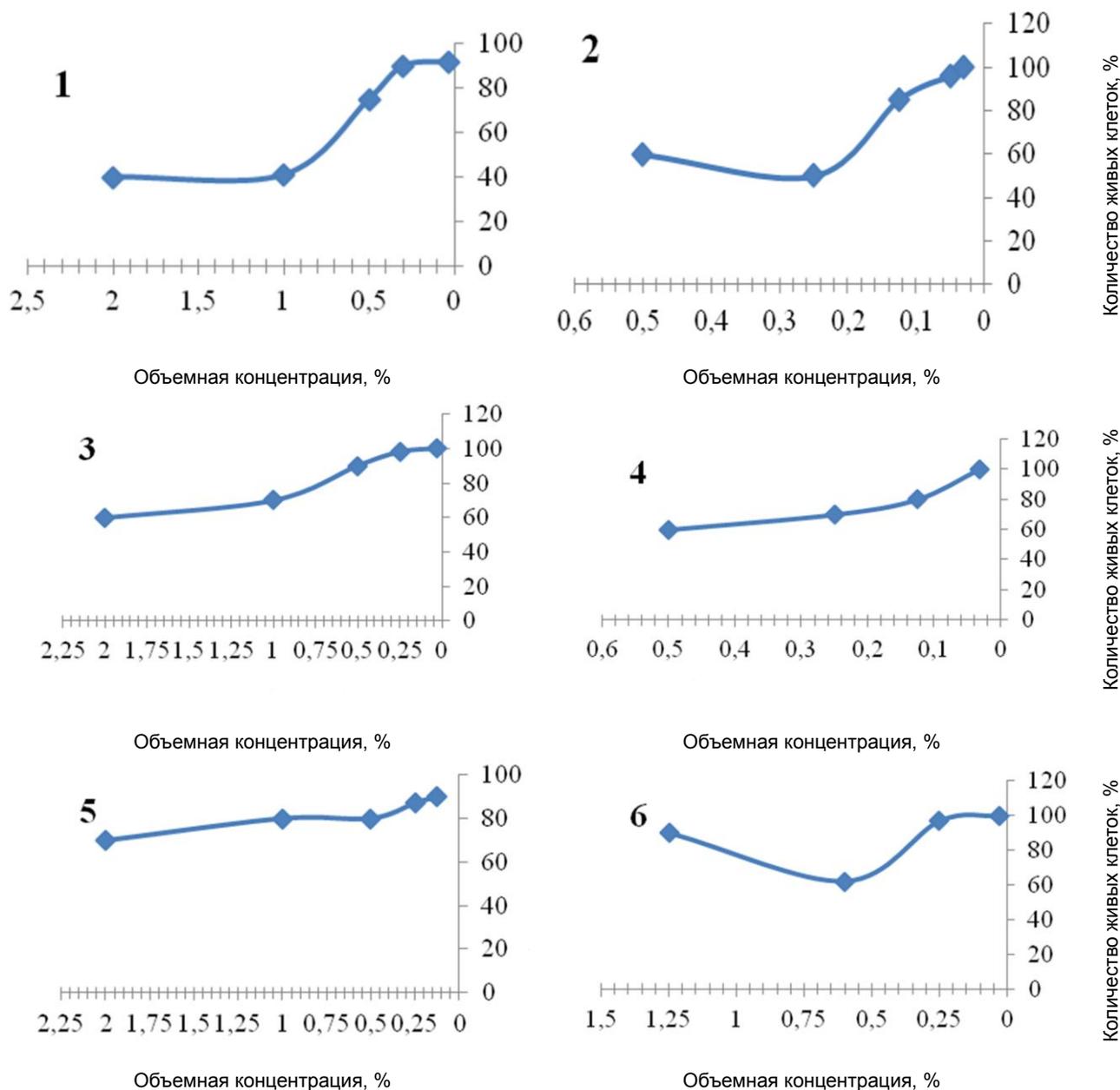
дили по калибровочной кривой и выражали в ммоль Fe²⁺/1 кг исходного сырья.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты выполнены в трех повторах. Средние значения и среднеквадратичные отклонения рассчитывали с помощью пакета программ Microsoft Excel. Для определения статистической значимости выявленных различий использовали парный двухвыборочный *t*-тест Стьюдента для средних. Во всех случаях статистические критерии считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты МТТ-теста на цитотоксичность. При проведении МТТ-теста на цитотоксичность исследуемых экстрактов в широком диапазоне концентраций (0,031–2% об.) было

показано, что все экстракты обладают цитотоксическим эффектом на раковые клетки толстого кишечника НСТ-116, причем этот эффект различается в зависимости от исследуемого экстракта и является дозозависимым (рис. 1). Так, наиболее цитотоксичным оказался экстракт женьшеня (7): при концентрации 1% об. количество жизнеспособных клеток составило 11% от контроля. Наименее цитотоксичным оказался экстракт кофе (9): при его концентрации в среде 2% об. количество жизнеспособных клеток составило 77% относительно контроля. Также были достигнуты нетоксичные концентрации экстрактов 1–9 и выбраны рабочие концентрации для исследования влияния экстрактов на уровень экспрессии генов COX-2, *i*NOS и IL-8 (см. табл. 2).



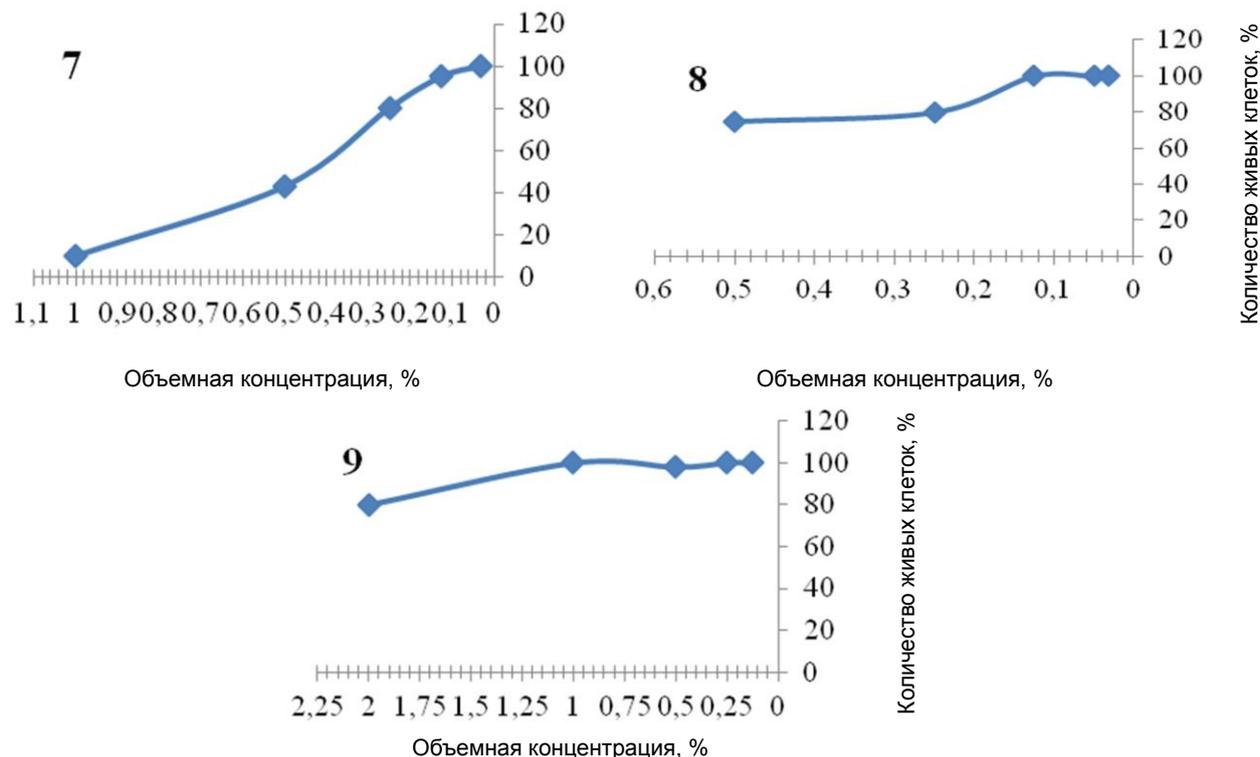


Рис. 1. Влияние экстрактов на жизнеспособность клеток HCT-116:

1 – брусника; 2 – малина; 3 – черноплодная рябина; 4 – семена винограда; 5 – выжимки винограда; 6 – зеленый Краснодарский чай; 7 – женьшень; 8 – иван-чай; 9 – кофе; стоковые водные растворы с объемным содержанием этанола 8,5 %

Fig. 1. Effect of extracts on the viability of HCT-116 cells:

1 – lingonberry; 2 – raspberries; 3 – chokeberry; 4 – grape seeds; 5 – pomace of grapes; 6 – green Krasnodar tea; 7 – ginseng; 8 – fireweed; 9 – coffee; stock aqueous solutions with a volumetric ethanol content of 8.5%

Таблица 3. Рабочие концентрации экстрактов при проведении количественного ПЦР-анализа
 Table 3. Working concentrations of extracts during quantitative PCR analysis

Экстракт	Рабочая концентрация, % об.	
	1	2
1 – брусника (<i>Vaccinium vitis-idaea</i>)	0,35	0,175
2 – малина (<i>Rubus idaeus</i>)	0,0625	0,03125
3 – черноплодная рябина (<i>Aronia melanocarpa</i>)	0,5	0,25
4 – семена винограда (<i>Vitis L.</i>)	0,0625	0,03125
5 – выжимки винограда (<i>Vitis L.</i>)	0,5	0,25
6 – зеленый Краснодарский чай (<i>Camellia sinensis</i>)	0,3125	0,15625
7 – женьшень (<i>Panax L.</i>)	0,2	0,1
8 – иван-чай (<i>Chamaenerion angustifolium</i>)	0,25	0,125
9 – кофе (<i>Coffea arabica</i>)	1,5	0,75

Результаты количественного ПЦР-анализа. ПЦР-анализ экспрессии гена *COX-2* после обработки раковых клеток толстого кишечника линии HCT-116 показал, что в целом все экстракты оказывают ингибирующее действие на экспрессию данного гена. Влияние ряда экстрактов на экспрессию гена *COX-2* носило дозозависимый характер. Так, из диаграмм, представленных на рис. 2, видно, что экстракт брусники (1) в концентрации 0,35% об. вызывает снижение экспрессии *COX-2* на 56%, а в концентрации 0,18% об. – на 22%. Экстракт черноплодной рябины (3) в концентрации 0,5% об. подавляет транскрипцию гена *COX-2* на 47%, в концентрации 0,25% об. – на

16%. Наиболее ярко подобный эффект был выражен после обработки клеток экстрактом женьшеня (7): экспрессия *COX-2* снизилась более чем в 10 раз после инкубации клеток с данным экстрактом в максимальной концентрации. Аналогичные дозовые зависимости, но в меньшей степени, наблюдались для экстрактов малины (2), семян винограда (4). Обратная дозозависимость (максимальное подавление экспрессии *COX-2* при минимальной концентрации) была продемонстрирована для экстрактов зеленого чая (6) и иван-чая (8). Для экстрактов из выжимок винограда (5) и кофе (9) ни прямой, ни обратной зависимости не наблюдалось. Данные эффекты

могут быть связаны как с множественностью эффектов химических соединений, содержащихся в исследуемых экстрактах, на противовоспалительные сигнальные пути, так и с авторегуляцией экспрессии исследуемых генов по механизму отрицательной обратной связи.

При анализе экспрессии гена *iNOS* были продемонстрированы зависимости, представленные на рис. 3. Так, наиболее выраженное дозозависимое ингибирующее действие на экспрессию *iNOS* оказывали экстракт черноплодной рябины (3), экстракт зеленого чая (6) и экстракт иван-чая (8). В случае обработки клеток экстрактом черноплодной рябины в концентрации 0,5% об. было продемонстрировано снижение экспрессии *iNOS* на 83%, в то время как в концентрации 0,25% об. экспрессия исследуемого гена была подавлена только на 41%. Для зеленого чая эти показатели составили 85 и 52% соответственно. Иван-чай в максимальной концентрации также снижал экспрессию *iNOS* более чем в 10 раз, и на 33% – при использовании 2х-кратного разведения максимальной концентрации. Аналогичную дозозависимую зависимость в менее выраженной степени продемонстрировали экстракты брусники (1), малины (2), семян винограда (4), женьшеня (7). Обратную дозозависимость

наблюдали в случае выжимок винограда (5). Отсутствие дозозависимости было показано для экстракта кофе (9).

В ходе ПЦР-анализа влияния экстрактов 1–9 на экспрессию гена *IL-8* было показано, что все экстракты в той или иной степени ингибируют экспрессию данного гена. Наиболее выраженно этот эффект наблюдали в случае экстрактов черноплодной рябины (3), выжимок винограда (5) и иван-чая (8). Так, при обработке клеток НСТ-116 экстрактом черноплодной рябины в концентрации 0,5% об. подавляет экспрессию *IL-8* на 75%, в концентрации 0,25% об. – на 51%. Для экстрактов выжимок винограда и зеленого чая эти показатели составили 60 и 46%, 81 и 91%, соответственно. Можно увидеть, что в случае иван-чая имеет место обратная дозозависимость. Менее выраженная дозозависимость была продемонстрирована для экстрактов малины (2), семян винограда (4), зеленого чая (6). Обратную дозозависимость наблюдали в случае экстрактов брусники (1), кофе (9). Эффект экстракта женьшеня (7) на экспрессию *IL-8* не зависел от дозы исследуемого экстракта. Данные по влиянию исследуемых экстрактов на экспрессию гена *IL-8* представлены на рис. 4.

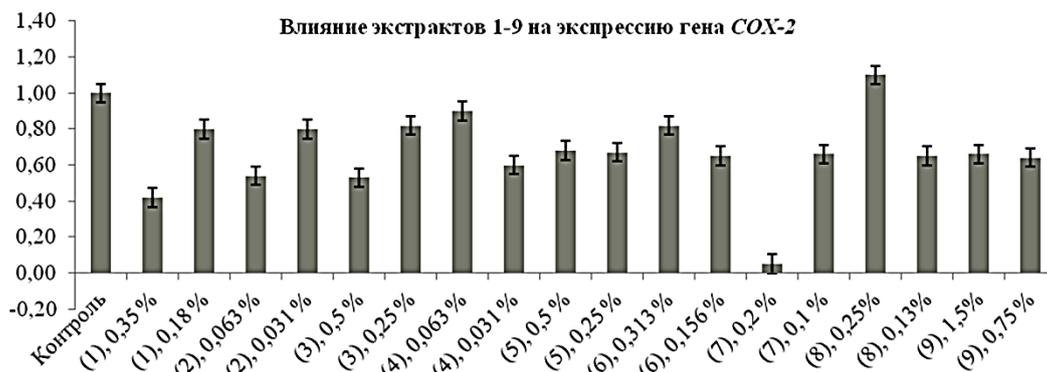


Рис. 2. Влияние экстрактов на экспрессию гена COX-2. Экстракты: 1 – брусника; 2 – малина; 3 – черноплодная рябина; 4 – семена винограда; 5 – выжимки винограда; 6 – зеленый Краснодарский чай; 7 – женьшень; 8 – иван-чай; 9 – кофе

Fig. 2. Effect of extracts on COX-2 gene expression. Extracts: 1 – lingonberry; 2 – raspberries; 3 – chokeberry; 4 – grape seeds; 5 – pomace of grapes; 6 – green Krasnodar tea; 7 – ginseng; 8 – fireweed; 9 – coffee

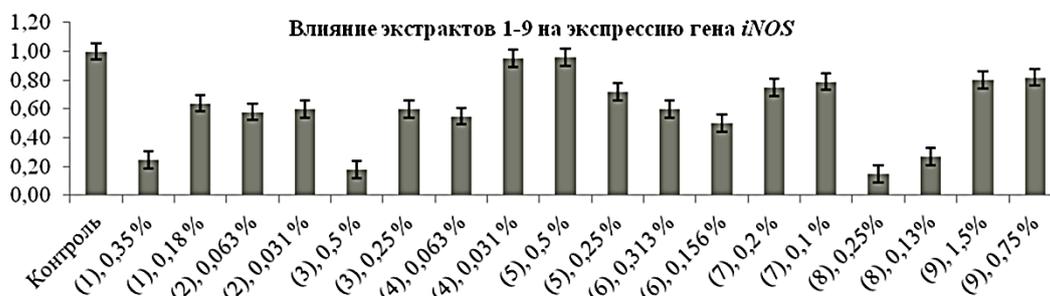


Рис. 3. Влияние экстрактов на экспрессию гена iNOS. Экстракты: 1 – брусника; 2 – малина; 3 – черноплодная рябина; 4 – семена винограда; 5 – выжимки винограда; 6 – зеленый Краснодарский чай; 7 – женьшень; 8 – иван-чай; 9 – кофе

Fig. 3. Effect of extracts on iNOS gene expression. Extracts: 1 – lingonberry; 2 – raspberries; 3 – chokeberry; 4 – grape seeds; 5 – pomace of grapes; 6 – green Krasnodar tea; 7 – ginseng; 8 – fireweed; 9 – coffee

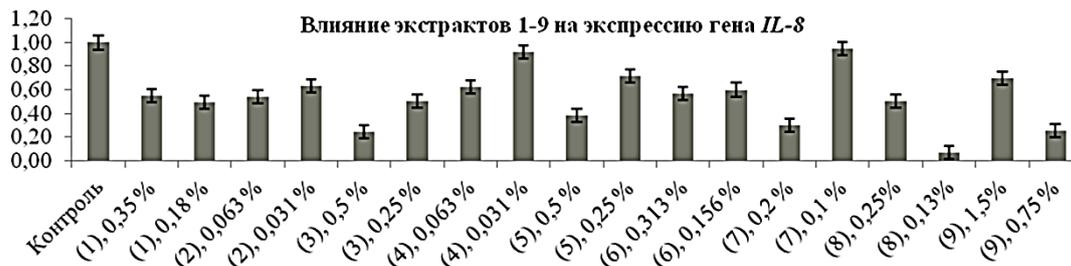


Рис. 4. Влияние экстрактов на экспрессию гена *IL-8*.

Экстракты: 1 – брусника; 2 – малина; 3 – черноплодная рябина; 4 – семена винограда; 5 – выжимки винограда; 6 – зеленый Краснодарский чай; 7 – женьшень; 8 – иван-чай; 9 – кофе

Fig. 4. Effect of extracts on *IL-8* gene expression.

Extracts: 1 – lingonberry; 2 – raspberries; 3 – chokeberry; 4 – grape seeds; 5 – pomace of grapes; 6 – green Krasnodar tea; 7 – ginseng; 8 – fireweed; 9 – coffee

Таким образом, в ходе работы было продемонстрировано, что все исследуемые экстракты способны снижать экспрессию провоспалительных генов *COX-2*, *iNOS* и *IL-8*, что подтверждают многочисленные исследования [7–9]. Наиболее выраженным суммарным ингибирующим действием на экспрессию данных генов обладали экстракты черноплодной рябины (3) и иван-чая (8). Данные экстракты рекомендуется использовать в дальнейших исследованиях влияния на индуцированную экспрессию генов *COX-2*, *iNOS* и *IL-8*, а также в исследованиях антиканцерогенной активности *in vivo*.

Улавливание свободных радикалов играет важную роль в формировании общей системы антиоксидантной активности, в том числе и для живых клеток. Именно 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH) является одним из широко используемых реактивов для определения антирадикальной активности благодаря его простоте, широкой апробированности, наглядности и точности измерений. Проведенные анализы по радикалу-держивающей способности методом DPPH выявили, что лидером являются экстракты черно-

плодной рябины (1,0 мг/см³), малины (2,0 мг/см³), семян винограда (3,1 мг/см³) и иван-чая (4,0 мг/см³). FRAP-метод является одним из самых надежных и востребованных методов для оценки способности антиоксиданта тормозить катализирующее действие ионов металлов на окислительные процессы. В случае определения железосвязывающей способности по методу FRAP определено, что наибольшей силой обладают также экстракты женьшеня (10,19 ммоль Fe²⁺/кг), черноплодной рябины (18,2 ммоль Fe²⁺/кг), иван-чая (22,14 ммоль Fe²⁺/кг) и малины (22,3 ммоль Fe²⁺/кг). На рис. 5 приведены показатели антирадикальной активности по методу DPPH и восстанавливающей силы по методу FRAP. Во всех показателях наибольшую активность проявляют одни и те же экстракты, а именно, экстракты черноплодной рябины, малины и иван-чая. Сравнительный анализ данных, представленных на рис. 2–4, и данных рис. 5 позволяет предположить, что в проявлении антиоксидантной и антиканцерогенной активностей задействованы одни и те же группы химических соединений.

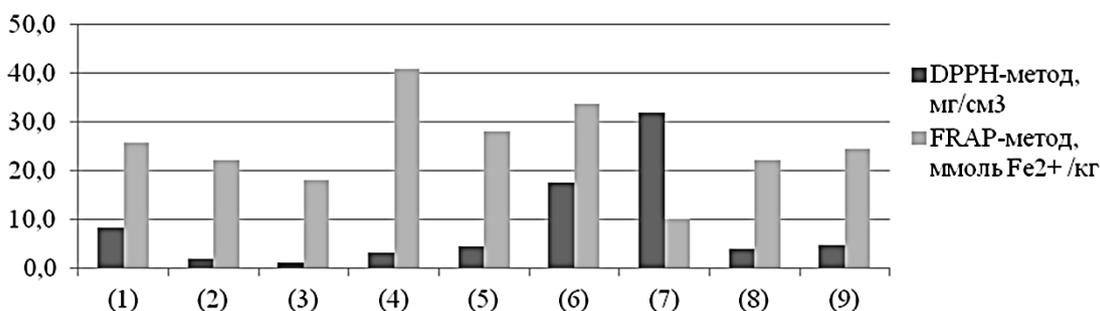


Рис. 5. Антирадикальная активность по методу DPPH и восстанавливающая сила по методу FRAP

Экстракты: 1 – брусника; 2 – малина; 3 – черноплодная рябина; 4 – семена винограда; 5 – выжимки винограда; 6 – зеленый Краснодарский чай; 7 – женьшень; 8 – иван-чай; 9 – кофе

Fig. 5. Antiradical activity according to DPPH method and restoring force according to FRAP method

Extracts: 1 – lingonberry; 2 – raspberries; 3 - chokeberry; 4 – grape seeds; 5 - pomace of grapes; 6 – green Krasnodar tea; 7 - ginseng; 8 – ivan tea; 9 – coffee

ВЫВОДЫ

При проведении МТТ-теста на цитотоксичность установлено, что наиболее цитотоксичным оказался экстракт женьшеня (7), а наименее – экстракт кофе (9). Также были достигнуты нетоксичные концентрации анализируемых экстрактов.

В ходе работы было продемонстрировано, что все исследуемые экстракты способны снижать экспрессию провоспалительных генов COX-2, iNOS и IL-8. Наиболее выраженное суммарное ингибирующее действие на экспрессию данных генов

имели экстракты черноплодной рябины (3) и иван-чая (8). Данные экстракты рекомендуется использовать в дальнейших исследованиях влияния на индуцированную экспрессию генов COX-2, iNOS и IL-8, а также в исследованиях антиканцерогенной активности *in vivo*.

Во всех показателях наибольшую антиоксидантную активность проявляют одни и те же экстракты, а именно, экстракты черноплодной рябины, малины и иван-чая, что коррелируются с данными по антиканцерогенной активности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Jupp P.W. A complex systems approach to cancer prevention // *Medical Hypotheses*. 2018. Vol. 112. P. 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.01.006>
2. Bail J., Meneses K., Demark-Wahnefried W. Nutritional status and diet in cancer prevention // *Seminars in Oncology Nursing*. 2016. Vol. 32. Issue 3. P. 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2016.05.004>
3. Жестовская Е.С., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Василевский С.В., Аксенов А.В., Аксенова Ю.Б., [и др.]. Исследование компонентного состава лекарственного растительного сырья методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // *Химия растительного сырья*. 2018. N 3. С. 149–157 <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018033433>
4. Greenlee H. Natural products for cancer prevention // *Seminars in Oncology Nursing*. 2012. Vol. 28. Issue 1. P. 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2011.11.004>
5. Sae-leaw T., Benjakul S. Prevention of melanosis in crustaceans by plant polyphenols: A review // *Trends in Food Science & Technology*. 2019. Vol. 85. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.003>
6. Curti V., di Lorenzo A., Dacrema M., Xiao J., Nabavi S.M., Daglia M. *In vitro* polyphenol effects on apoptosis: an update of literature data // *Seminars in Cancer Biology*. 2017. Vol. 46. P. 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.08.005>
7. Gali-Muhtasib H., Hmadi R., Kareh M., Tohme R., Darwiche N. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis // *Apoptosis*. 2015. Vol. 20. Issue 12. P. 1531–1562. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1169-2>
8. Dayem A.A., Choi H.Y., Yang G.-M., Kim K., Saha S.K., Cho S.-G. The anticancer effect of polyphenols against breast cancer and cancer stem cells: molecular mechanisms // *Nutrients*. 2016. Vol. 8. Issue 9. P. 581. <https://doi.org/10.3390/nu8090581>
9. Lewandowska H., Kalinowska M., Lewandowski W., Stepkowski T.M., Brzoska K. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016. Vol. 32. P. 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.11.006>
10. Li W., Guo Y., Zhang C., Wu R., Yang A.Y., Gaspar J., et al. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a perspective on oxidative stress, inflammation, and epigenetics // *Chemical Research in Toxicology*. 2016. Vol. 29. Issue 12. P. 2071–2095. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00413>
11. Wu J.C., Lai C.S., Lee P.S., Ho C.T., Liou W.S., Wang Y.J., et al. Anti-cancer efficacy of dietary polyphenols is mediated through epigenetic modifications // *Current Opinion in Food Science*. 2016. Vol. 8. P. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.01.009>
12. Di Leo N., Battaglini M., Berger L., Giannaccini M., Dente L., Hampel S., et al. A catechin nanoformulation inhibits WM266 melanoma cell proliferation, migration and associated neo-angiogenesis // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017. Vol. 114. P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.024>
13. Morbidelli L. Polyphenol-based nutraceuticals for the control of angiogenesis: analysis of the critical issues for human use // *Pharmacological Research*. 2016. Vol. 111. P. 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.011>
14. Amani H., Ajami M., Nasser Maleki S., Pazoki-Toroudi H., Daglia M., Tsetegho Sokeng A.J., et al. Targeting signal transducers and activators of transcription (STAT) in human cancer by dietary polyphenolic antioxidants // *Biochimie*. 2017. Vol. 142. P. 63–79. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.08.007>
15. Omidian K., Rafiei H., Bandy B. Polyphenol inhibition of benzo[a]pyrene-induced oxidative stress and neoplastic transformation in an *in vitro* model of carcinogenesis // *Food and Chemical Toxicology*. 2017. Vol. 106 (Pt. A). P. 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.037>
16. Mahendran G., Ponnuchamy K. Coumarin-gold nanoparticle Coumarin-gold nanoparticle bioconjugates: preparation, antioxidant, and cytotoxic effects against MCF-7 breast cancer cells // *Applied Nanoscience*. 2018. Vol. 8. P. 447–453. <https://doi.org/10.1007/s13204-018-0816-7>
17. Campestrini L.H., Melo P.S., Peres L.E.P., Calhelha R.C., Ferreira I.C.F.R., Alencar S.M. A new variety of purple tomato as a rich source of bioactive carotenoids and its potential health benefits // *Heliyon*. 2019. Vol. 5. Issue 11. P. e02831. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02831>
18. Oliveira-Alves Sh.C., Pereira R.S., Pereira

A.B., Ferreira A., Mecha E., Bento da Silva A., et al. Identification of functional compounds in baru (*Dip-teryx alata* Vog.) nuts: Nutritional value, volatile and phenolic composition, antioxidant activity and anti-proliferative effect // Food Research International. 2020. Vol. 131. P. 109026. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109026>

19. Zhamanbayeva G.T., Aralbayeva A.N., Mur-zakhmetova M.K., Tuleukhanov S.T., Danilenko M. Cooperative antiproliferative and differentiation-enhancing activity of medicinal plant extracts in acute myeloid leukemia cells // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2016. Vol. 82. P. 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.04.062>

20. Lage N.N., Layosa M.A.A., Arbizu S., Chew B.P., Pedrosa M.L., Mertens-Talcott S., et al. Dark sweet cherry (*Prunus avium*) phenolics enriched in anthocyanins exhibit enhanced activity against the most aggressive breast cancer subtypes without toxicity to normal breast cells // Journal of Functional Foods. 2020. Vol. 64. P. 103710. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103710>

21. Joanitti G.A., Azevedo R.B., Freitas S.M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds // Cancer Letters. 2010. Vol. 293. Issue 1. P. 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.12.017>

22. Jeong J.-H., Jung H., Lee S.-R., Lee H.-J., Hwang K.T., Kim T.-Y. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine // Food Chemistry. 2010. Vol. 123. Issue 2. P. 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.040>

23. Luo C., Zhang H. The role of proinflammatory pathways in the pathogenesis of colitis-associated colorectal cancer // Mediators of Inflammation. 2017. Vol. 2017. Article ID 5126048. <https://doi.org/10.1155/2017/5126048>

24. Agrawal U., Kumari N., Vasudeva P., Mohanty N.K., Saxena S. Overexpression of COX2 indicates poor survival in urothelial bladder cancer // Annals of Diagnostic Pathology. 2018. Vol. 34. P. 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.01.008>

25. Li W., Lin S., Li W., Wang W., Li X., Xu D. IL-8 interacts with metadherin promoting proliferation and migration in gastric cancer // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2016. Vol. 478. Issue 3. P. 1330–1337. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.123>

26. Issy A.C., Nascimento G.C., Dias de Abreu G.H., Tristão F.S., Del-Bel E., Duarte T., et al. Differential behavioral and glial responses induced by

dopaminergic mechanisms in the iNOS knockout mice // Behavioural Brain Research. 2018. Vol. 350. P. 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.05.002>

27. Wu H.X., Cheng X., Jing X.-Q., Ji X.-P., Chen X.-Z., Zhang Y.-Q., et al. LIFR promotes tumor angiogenesis by up-regulating IL-8 levels in colorectal cancer // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease. 2018. Vol. 1864. Issue 9. Part B. P. 2769–2784. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.05.004>

28. Chang C.-Y., Chen J.-Y., Chen S.-H., Cheng T.-J., Lin M.-T., Hu M.-L. Therapeutic treatment with ascorbate rescues mice from heat stroke-induced death by attenuating systemic inflammatory response and hypothalamic neuronal damage // Free Radical Biology and Medicine. 2016. Vol. 93. P. 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.017>

29. Alfaro C., Sanmamed M.F., Rodríguez-Ruiz M.E., Teixeira Á., Onate C., González Á., et al. Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up // Cancer Treatment Reviews. 2017. Vol. 60. P. 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.08.004>

30. Shahat A.A., Hidayathulla S., Khan A.A., Alanazi A.M., Meanazel O.A., Alqahtani A.S., et al. Phytochemical profiling, antioxidant and anticancer activities of *Gastrocotyle hispida* growing in Saudi Arabia // Acta Tropica. 2019. Vol. 191. P. 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.013>

31. Omoni A.O., Aluko R.E. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review // Trends in Food Science & Technology. 2005. Vol. 16. Issue 8. P. 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.002>

32. Md Roduan M.R., Hamid R.A., Cheah Y.K., Mohtarrudin N. Cytotoxicity, antitumor-promoting and antioxidant activities of *Annona muricata* *in vitro* // Journal of Herbal Medicine. 2019. Vol. 15. P. 100219. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2018.04.004>

33. Vannini F., Kashfi K., Nath N. The dual role of iNOS in cancer // Redox Biology. 2015. Vol. 6. P. 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.009>

34. Schroy P.C., Brown-Shimer S., Kim K., Johnson K.A., Murnane M.J., Yang S., et al. Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay // Cancer. 1995. Vol. 76. Issue 2. P. 201–209. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19950715\)76:2<201::aid-cnrcr2820760207>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19950715)76:2<201::aid-cnrcr2820760207>3.0.co;2-t)

35. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jona'k J., Lind K., et al. The real-time polymerase chain reaction // Molecular Aspects of Medicine. 2006. Vol. 27. P. 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>

REFERENCES

1. Jupp PW. A complex systems approach to cancer prevention. *Medical Hypotheses*. 2018;112:18–23. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.01.006>

2. Bail J, Meneses K, Demark-Wahnefried W.

Nutritional status and diet in cancer prevention. *Seminars in Oncology Nursing*. 2016;32(3):206–214. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2016.05.004>

3. Zhestovskaya YeS, Antokhin AM, Taranchen-

- ko VF, Vasilevskiy SV, Aksenov AV, Aksenova YuB, et al. Study of component composition of medicinal plant materials by gas chromatography with mass-spectrometric detection. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*. 2018;3:149–157. (In Russian) <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018033433>
4. Greenlee H. Natural products for cancer prevention. *Seminars in Oncology Nursing*. 2012;28(1):29–44. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2011.11.004>
5. Sae-leaw T, Benjakul S. Prevention of melanosis in crustaceans by plant polyphenols: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2019;85:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.003>
6. Curti V, di Lorenzo A, Dacrema M, Xiao J, Nabavi SM, Daglia M. *In vitro* polyphenol effects on apoptosis: an update of literature data. *Seminars in Cancer Biology*. 2017;46:119–131. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2017.08.005>
7. Gali-Muhtasib H, Hmadi R, Kareh M, Tohme R, Darwiche N. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. *Apoptosis*. 2015;20(12):1531–1562. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1169-2>
8. Dayem AA, Choi HY, Yang G-M, Kim K, Saha SK, Cho S-G. The anticancer effect of polyphenols against breast cancer and cancer stem cells: molecular mechanisms. *Nutrients*. 2016;8(9):581. <https://doi.org/10.3390/nu8090581>
9. Lewandowska H, Kalinowska M, Lewandowski W, Stepkowski TM, Brzoska K. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016;32:1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.11.006>
10. Li W, Guo Y, Zhang C, Wu R, Yang AY, Gaspar J, et al. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a perspective on oxidative stress, inflammation, and epigenetics. *Chemical Research in Toxicology*. 2016;29(12):2071–2095. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00413>
11. Wu JC, Lai CS, Lee PS, Ho CT, Liou WS, Wang YJ, et al. Anti-cancer efficacy of dietary polyphenols is mediated through epigenetic modifications. *Current Opinion in Food Science*. 2016;8:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.01.009>
12. Di Leo N, Battaglini M, Berger L, Giannaccini M, Dente L, Hampel S, et al. A catechin nanoformulation inhibits WM266 melanoma cell proliferation, migration and associated neo-angiogenesis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;114:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.024>
13. Morbidelli L. Polyphenol-based nutraceuticals for the control of angiogenesis: analysis of the critical issues for human use. *Pharmacological Research*. 2016;111:384–393. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.011>
14. Amani H, Ajami M, Nasser Maleki S, Pazoki-Toroudi H, Daglia M, Tsetegho Sokeng AJ, et al. Targeting signal transducers and activators of transcription (STAT) in human cancer by dietary polyphenolic antioxidants. *Biochimie*. 2017;142:63–79. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.08.007>
15. Omidian K, Rafiei H, Bandy B. Polyphenol inhibition of benzo[a]pyrene-induced oxidative stress and neoplastic transformation in an *in vitro* model of carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 2017;106:165–174. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.037>
16. Mahendran G, Ponnuchamy K. Coumarin-gold nanoparticle Coumarin-gold nanoparticle bioconjugates: preparation, antioxidant, and cytotoxic effects against MCF-7 breast cancer cells. *Applied Nanoscience*. 2018;8:447–453. <https://doi.org/10.1007/s13204-018-0816-7>
17. Campestrini LH, Melo PS, Peres LEP, Calheta RC, Ferreira ICFR, Alencar SM. A new variety of purple tomato as a rich source of bioactive carotenoids and its potential health benefits. *Heliyon*. 2019;5(11):e02831. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02831>
18. Oliveira-Alves ShC, Pereira RS, Pereira AB, Ferreira A, Mecha E, Bento da Silva A, et al. Identification of functional compounds in baru (*Dipteryx alata* Vog.) nuts: Nutritional value, volatile and phenolic composition, antioxidant activity and antiproliferative effect. *Food Research International*. 2020;131:109026. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109026>
19. Zhamanbayeva GT, Aralbayeva AN, Murzakhmetova MK, Tuleukhanov ST, Danilenko M. Cooperative antiproliferative and differentiation-enhancing activity of medicinal plant extracts in acute myeloid leukemia cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;82:80–89. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.04.062>
20. Lage NN, Layosa MAA, Arbizu S, Chew BP, Pedrosa ML, Mertens-Talcott S, et al. Dark sweet cherry (*Prunus avium*) phenolics enriched in anthocyanins exhibit enhanced activity against the most aggressive breast cancer subtypes without toxicity to normal breast cells. *Journal of Functional Foods*. 2020;6:103710. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103710>
21. Joanitti GA, Azevedo RB, Freitas SM. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer Letters*. 2010;293(1):73–81. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.12.017>
22. Jeong J-H, Jung H, Lee S-R, Lee H-J, Hwang KT, Kim T-Y. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. *Food Chemistry*. 2010;123(2):338–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.040>
23. Luo C, Zhang H. The role of proinflammatory pathways in the pathogenesis of colitis-associated colorectal cancer. *Mediators of Inflammation*. 2017;2017:5126048. <https://doi.org/10.1155/2017/5126048>

24. Agrawal U, Kumari N, Vasudeva P, Mohanty NK, Saxena S. Overexpression of COX2 indicates poor survival in urothelial bladder cancer. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2018;34:50–55. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.01.008>
25. Li W, Lin S, Li W, Wang W, Li X, Xu D. IL-8 interacts with metadherin promoting proliferation and migration in gastric cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;478(3):1330–1337. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.123>
26. Issy AC, Nascimento GC, de Abreu GHD, Tristão FS, Del-Bel E, Duarte T, et al. Differential behavioral and glial responses induced by dopaminergic mechanisms in the iNOS knockout mice. *Behavioural Brain Research*. 2018;35:44–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.05.002>
27. Wu HX, Cheng X, Jing X-Q, Ji X-P, Chen X-Z, Zhang Y-Q, et al. LIFR promotes tumor angiogenesis by up-regulating IL-8 levels in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 2018;1864(9):2769–2784. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.05.004>
28. Chang C-Y, Chen J-Y, Chen S-H, Cheng T-J, Lin M-T, Hu M-L. Therapeutic treatment with ascorbate rescues mice from heat stroke-induced death by attenuating systemic inflammatory response and hypothalamic neuronal damage. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;93:84–93. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.017>
29. Alfaro C, Sanmamed MF, Rodríguez-Ruiz ME, Teijeira Á, Onate C, González Á, et al. Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. *Cancer Treatment Reviews*. 2017;60:24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.08.004>
30. Shahat AA, Hidayathulla S, Khan AA, Alanazi AM, Meanazel OA, Alqahtani AS, et al. Phytochemical profiling, antioxidant and anticancer activities of *Gastrocotyle hispida* growing in Saudi Arabia. *Acta Tropica*. 2019;191:243–247. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.013>
31. Omoni AO, Aluko RE. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2005;16(8):344–350. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.002>
32. Md Roduan MR, Hamid RA, Cheah YK, Mohtarrudin N. Cytotoxicity, antitumor-promoting and antioxidant activities of *Annona muricata* *in vitro*. *Journal of Herbal Medicine*. 2019;15:100219. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2018.04.004>
33. Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biology*. 2015;6:334–343. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.009>
34. Schroy PC, Brown-Shimer S, Kim K, Johnson KA, Murnane MJ, Yang S, et al. Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer*. 1995;76(2):201–209. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19950715\)76:2<201::aid-cnrcr2820760207>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19950715)76:2<201::aid-cnrcr2820760207>3.0.co;2-t)
35. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Foortan A, Jona'k J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27:95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Еремеева Наталья Борисовна,
к.т.н., доцент кафедры технологии
и организации общественного питания,
Самарский государственный технический
университет,
443100, г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244,
Российская Федерация,
✉ e-mail: eremeeva.nb.samgtu@gmail.com

Макарова Надежда Викторовна,
д.х.н., профессор, заведующая кафедрой
технологии и организации общественного
питания,
Самарский государственный технический
университет,
443100, г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244,
Российская Федерация,
e-mail: makarovnv1969@yandex.ru

Игнатова Динара Фанисовна,
к.т.н., доцент кафедры технологии
и организации общественного питания,
Самарский государственный технический
университет,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalya B. Eremeeva,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Department of Technology and Organization
of Catering,
Samara State Technical University,
244, Molodogvardeiskaya St., Samara, 443100,
Russian Federation,
✉ e-mail: eremeeva.nb.samgtu@gmail.com

Nadezhda V. Makarova,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Head of Department of Technology
and Organization of Catering,
Samara State Technical University,
244, Molodogvardeiskaya St., Samara, 443100,
Russian Federation,
e-mail: makarovnv1969@yandex.ru

Dinara F. Ignatova,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Department of Technology and Organization
of Catering
Samara State Technical University,

443100, г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244
Российская Федерация,
e-mail: dinara-bakieva@mail.ru

Бахарев Владимир Валентинович,
д.х.н., профессор, декан факультета пищевых
производств,
Самарский государственный технический
университет,
443100, г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244
Российская Федерация,
e-mail: fpp@samgtu.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта ин-
тересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Статья поступила в редакцию 21.11.2020;
одобрена после рецензирования 21.10.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

244, Molodogvardeiskaya St., Samara, 443100,
Russian Federation,
e-mail: dinara-bakieva@mail.ru

Vladimir V. Bakharev,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Dean of Faculty of Food Production,
Samara State Technical University,
244, Molodogvardeiskaya St., Samara, 443100,
Russian Federation,
e-mail: fpp@samgtu.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 21.11.2020;
approved after reviewing 21.10.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*

Обзорная статья / Review article

УДК 577.29

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-627-638>



Система сахаропосредованной регуляции и роль киназ HXK1, SnRK1, TOR у *Arabidopsis thaliana*

© В.И. Бельков*, Е.Ю. Гарник*, В.И. Тарасенко*, Ю.М. Константинов**

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, Российская Федерация

**Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: Сахара – важный компонент общего метаболизма растений. Они являются не только источником энергии в организме, но и неотъемлемой составляющей сложной сети внутриклеточного сигналинга. Сигналы с участием сахаров регулируют множество метаболических реакций у растений, в том числе метаболизм углерода и азота, а также ответ на биотический и абиотический стрессы. В представленной работе дан краткий обзор современных знаний о сахарах как метаболитах и сигнальных молекулах. Также описаны различные пути передачи сахаропосредованных сигналов, среди которых рассматриваются как хорошо известные, так и недавно обнаруженные, их взаимодействие и роль в регуляции метаболизма растений и экспрессии ядерных генов. Одним из первых изученных участников сети сахаропосредованных сигналов является гексокиназа 1 (фермент синтеза глюкозы), которая вовлечена в регуляцию экспрессии многих ядерных генов в ответ на изменения уровня глюкозы в организме. Следует отметить, что ее участие в передаче митохондриально-ядерных сигналов и регуляции процессов старения растений выходит за рамки регуляции метаболических реакций, что позволяет рассматривать гексокиназу 1 как регулятор широкого спектра действия. Особый интерес представляет участие сахаропосредованных сигналов в переключении метаболических реакций организма в ответ на изменения углеводного статуса. Дефицит сахаров приводит к выключению большинства энергозатратных процессов и одновременно стимулирует фотосинтез, либо (при его отсутствии) за счет активации киназы SnRK1 усиливает катаболические реакции. При достаточном уровне сахаров происходит репрессия киназы SnRK1 и активация TOR-киназы, которая стимулирует анаболические реакции и рост. Рассмотрено значение конкурирующих SnRK1 и TOR-киназ как главных регуляторов этого переключения. Кроме того, рассмотрена роль сигналов, опосредуемых трегалозо-6-фосфатом, во многом функционально схожих с TOR-сигналингом. Все эти регуляторные механизмы помогают растениям своевременно адаптироваться к изменениям факторов внешней среды и поддерживать гомеостаз. Возможно, в ближайшее время будет получена дополнительная информация о взаимодействии у растений энергетических и стресс-зависимых сигналов, осуществляемом через антагонизм киназ TOR и SnRK1.

Ключевые слова: гексокиназа 1, протеинкиназа SnRK1, TOR-киназа, *Arabidopsis thaliana*, сахаропосредованный сигналинг, транскрипционные факторы

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 18-34-00800.

Для цитирования: Бельков В.И., Гарник Е.Ю., Тарасенко В.И., Константинов Ю.М. Система сахаропосредованной регуляции и роль киназ HXK1, SnRK1, TOR у *Arabidopsis thaliana*. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 4. С. 627–638. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-627-638>

Sugar-mediated regulation and the role of HXK1, SnRK1, TOR kinases in *Arabidopsis thaliana*

Vadim I. Belkov*, Elena Yu. Garnik*, Vladislav I. Tarasenko*, Yuri M. Konstantinov**

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS,
Irkutsk, Russian Federation

**Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: Sugars play an important role in plant metabolism. They are not only a source of energy, but also an integral part of the intracellular signalling network. Signals involving sugars regulate a variety of metabolic reactions, e.g. carbon and nitrogen metabolism, and produce plant response to biotic and abiotic stresses. This paper provides a brief review of modern publications about sugars acting as metabolites and signalling

molecules. The well-known and recently discovered pathways for the transmission of sugar-mediated signals are described, along with their role in the regulation of plant metabolism and expression of nuclear genes. Hexokinase 1 (an enzyme for glucose synthesis), which was one of the first studied participants in the sugar-mediated signalling network, regulates the expression of many nuclear genes in response to changes in the glucose level. Hexokinase 1 should be considered as a broad-spectrum regulator due to its participation in the transmission of mitochondrial-nuclear signals and regulation of aging processes in plants, which functions lay beyond the regulation of metabolic reactions. Of particular interest is the participation of sugar-mediated signals in the switching of metabolic reactions in response to changes in carbohydrate concentrations. Sugar deficiency deactivates most energy-intensive processes, at the same time as stimulating photosynthesis or (in its absence) enhancing catabolic reactions due to activation of the SnRK1 kinase. Under sufficient sugar levels, the SnRK1 kinase is suppressed and the TOR kinase is activated, which stimulates anabolic reactions and growth. The role of competing SnRK1 and TOR kinases as the main regulators of such a process is considered, along with the function of signals mediated by trehalose-6-phosphate highly similar to the TOR signalling pathway. All these regulatory mechanisms enable plants to adapt to environmental changes and maintain homeostasis. It is possible that additional information will be obtained in the nearest future on the interaction of energy and stress-dependent signals in plants through the antagonism of TOR and SnRK1.

Keywords: hexokinase 1, protein kinase SnRK1, TOR kinase, *Arabidopsis thaliana*, sugar signalling, transcription factors

Acknowledgments: This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant no. 18-34-00800.

For citation: Belkov VI, Garnik EYu, Tarasenko VI, Konstantinov YuM. Sugar-mediated regulation and the role of HXK1, SnRK1, TOR kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):627–638. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-627-638>

ВВЕДЕНИЕ

Сахара являются важнейшими компонентами метаболизма у всех живых организмов. Они служат основой для построения многих соединений, являются источником энергии в автотрофных и гетеротрофных тканях растений. Помимо этого некоторые сахара могут играть роль сигнальных молекул и принимать участие в регуляции экспрессии ядерных генов, продукты которых участвуют в реакциях фотосинтеза, азотном обмене и др. [1]. Сигнальные пути с участием сахаров вовлечены в процессы переключения между ювенильной и взрослой стадиями, а также в переходе от вегетативного к репродуктивному состоянию [2]. Многие компоненты сахаропосредованной регуляторной сети до сих пор полностью не изучены.

Среди наиболее изученных и хорошо описанных в литературе путей передачи сахаропосредованных сигналов у растений можно отметить сигнальные пути с участием протеинкиназы SnRK1, TOR-киназы и трегалозо-6-фосфата (Т6Р) [3, 4]. Эти соединения активно участвуют в метаболических процессах растений в качестве регуляторов, являются необходимыми компонентами для их естественного роста и развития. Все перечисленные регуляторные пути обеспечивают своевременную адаптацию метаболизма в ответ на любые изменения углеводного статуса. Сигналы, опосредуемые SnRK1-киназой, запускаются при экстремально низком уровне сахаров в организме, одновременно стимулируя фотосинтез и вызывая перераспределение имеющихся ресурсов,

высвобождаемых за счет катаболических реакций [5, 6]. Повышение уровня сахаров, в частности, глюкозы, которая может выступать в качестве сигнальной молекулы, вызывает активацию регуляторных путей с участием TOR-киназ, которые подавляют SnRK1-регуляцию, усиливают анаболические процессы и рост растений. В то же время повышение содержания Т6Р приводит к замедлению роста проростков арабидопсиса [7], усилению катаболизма белков, аминокислот и липидов, выключению энергозатратного синтеза некоторых белков [8].

Для исследований сахаропосредованной регуляции было получено множество мутантов арабидопсиса с измененной чувствительностью к глюкозе, сахарозе, трегалозе и др. Исследования, проведенные на таких мутантах, позволили раскрыть способы контроля метаболических путей углеводов [9]. Выявлено огромное число генов, экспрессия которых регулируется сахарозависимыми сигналами [10].

На данный момент не все компоненты сахаропосредованных путей выявлены до конца. Мало известно и о механизме регуляции этих путей в зависимости от тканеспецифичности. В ближайшее время должны быть проведены отдельные исследования, восполняющие эти пробелы, а также расширено представление о взаимодействии сахаропосредованных сигналов с гормонопосредуемыми сигналами. Особенности затруднения вызывает множественный эффект гормонов, который не всегда прост в интерпретации. Выполнение этих исследований, несо-

менно, представляет интерес как в рамках специфической тематики сахаропосредованного сигналинга, так и при рассмотрении с другими возможными внутриклеточными и межклеточными сигнальными путями.

В данном обзоре обобщены данные о структуре, функциях и пересечении главных путей сахаропосредованного сигналинга. В отечественной литературе число обзоров по данной тематике явно недостаточно, при этом зачастую они посвящены узким специализированным темам, не рассчитанным на широкий круг исследователей. Опубликованы работы, посвященные сигнальной функции оксида азота, фитогормонов, особенностям регуляции сахарозсинтазы, роли сигнальных путей с участием нитрат-иона в регуляции ферментов фотосинтеза и метаболизма азота и углерода. Цель предлагаемого обзора – обобщить данные об известных мессенджерах основных сахаропосредованных сигнальных путей у арабидопсиса, сравнить их роль в регуляции физиологических процессов, в том числе связанных с прорастанием семян, ростом проростков, переключением метаболических путей, а также рассмотреть их взаиморегуляцию и пересечение с сигналингом фитогормонов.

СИГНАЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ ГЛЮКОЗЫ И РОЛЬ НХК1

Глюкоза опосредует многие регуляторные пути у растений [11]. Использование неметаболизируемых гексоз позволило выявить и изучить возможные пути передачи сигналов с ее участием. Глюкозозависимая регуляция представлена целой сетью сигнальных путей, вовлеченных в регуляцию экспрессии более 2000 генов растений, значительная часть которых кодирует различные факторы транскрипции [12, 13]. Большую роль в передаче этого типа сигналов играют гексокиназы (*hexokinase*, НХК), выполняющие не только каталитическую функцию, но и выступающие в качестве первичного сенсора глюкозы [9, 14]. Гексокиназы арабидопсиса представлены шестью белками, три из которых (НХК1-3) имеют каталитическую активность, а также тремя гексокиназо-подобными белками (*hexokinase-like*, НХЛ), лишенными каталитической активности. Установлено, что регуляторную функцию осуществляют только белки НХК1, НХК3 и НХЛ3 [15].

Впервые регуляторная роль гексокиназ у растений была установлена в экспериментах по обработке изолированных протопластов пшеницы раствором глюкозы, в результате которых была выявлена ее роль в подавлении реакций гликосилатного цикла и экспрессии генов фотосинтеза [16].

Наиболее изученным сенсором глюкозы у растений является гексокиназа 1 (НХК1) – цитозольный фермент, катализирующий превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат. НХК1 входит в

состав высокомолекулярного комплекса ядерной локализации, регулирующего транскрипцию ядерных генов [17]. В исследованиях с применением мутантов арабидопсиса *gin2* (*glucose insensitive 2*), показана роль НХК1 в качестве первого звена при передаче внутриклеточных глюкозозависимых сигналов у растений. Мутантная линия *gin2-1* имеет дефект по гену гексокиназы 1 НХК1/GIN2, в результате мутантные растения сохраняют возможность синтезировать глюкозо-6-фосфат, но лишены регуляторной функции НХК1, то есть способности к связыванию и транспортировке молекул глюкозы. Глюкозозависимые изменения экспрессии ядерных генов у этих растений нарушаются, несмотря на сохранение каталитической функции НХК1. Таким образом, каталитическая функция НХК1 для передачи регуляторных сигналов, опосредуемых глюкозой, значения не имеет [3, 16].

НХК1 играет важную роль в регуляции цветения, роста корней и листьев в условиях повышенной освещенности ($200\text{--}300\text{ мкмоль}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ для арабидопсиса) [1, 11]. Отмечено, что повышение уровня глюкозы в апопласте пыльцевых трубок арабидопсиса вызывает остановку их роста, что опосредуется НХК1 [18]. Данные о двойственной функции НХК1 получены в экспериментах с мутантными и трансгенными линиями арабидопсиса, которые имели повышенную или пониженную чувствительность к глюкозе [17].

Присутствие в питательных средах глюкозы или сахарозы может тормозить прорастание семян и развитие проростков на ранних стадиях [19]. Выращивание растений дикого типа на средах с добавлением 2 или 3% глюкозы не оказывает существенного негативного действия на развитие проростков. В то же время концентрация глюкозы или сахарозы 6% может приводить к задержке прорастания семян на сутки и более, ухудшению развития листьев, формированию укороченных корней [20]. Однако растения арабидопсиса *AtHKK1*, сверхэкспрессирующие ген *HKK1*, были чувствительны к добавлению даже небольших количеств глюкозы в среду выращивания (2% глюкозы) [3, 19]. Растения линии *anti-AtHKK1* со сниженной экспрессией гена *HKK1* имели менее выраженную регуляторную активность гексокиназы 1 и не проявляли угнетения роста при обработке экзогенной глюкозой [17, 21].

У растений выявлены два основных пути передачи сигналов с участием глюкозы:

1. НХК1-зависимый путь, главная функция – подавление экспрессии генов, продукты которых участвуют в фотосинтезе и транспорте сахаров в клетку, а также участие в активации экспрессии некоторых генов. Так, у арабидопсиса глюкоза выступает как положительный регулятор экспрессии транскрипционных факторов MYB34, MYB51, MYB122 и генов *CYP79B2* и *CYP83B1*, которые отвечают за биосинтез вторичных мета-

болитов гликозинолатов, задействованных в различных биологических процессах, включая стрессовый ответ. Отсутствие индукции этих генов у мутантов *gin2-1* указывает на роль НХК1 в активации их экспрессии, а также позволяет предположить роль НХК1 в регуляции вторичного метаболизма [22].

2. НХК1-независимый путь. Известны гены, глюкозозависимая регуляция экспрессии которых у трансгенных линий арабидопсиса не изменяется, несмотря на сниженную или повышенную экспрессию гена *НХК1*. Такая НХК1-независимая регуляция обеспечивает защиту растений от патогенов и может быть опосредована глюкозой, сахарозой или фруктозой с привлечением помимо гексокиназы 1 других гексокиназ [23]. Передача сигналов этого типа может осуществляться через G-белок RGS1, который имеет 7 трансмембранных доменов и действует как высокочувствительный сенсор глюкозы. Регуляция с участием белка RGS1 приводит к остановке деления клеток и замедлению роста [9].

Отмечено тесное перекрывание сигналов, опосредуемых глюкозой, с сигналами, опосредуемыми фитогормонами [2]. Многие мутации арабидопсиса, связанные с нарушениями в передаче сахаропосредованных сигналов, являются аллельными к мутациям в генах, кодирующих ферменты синтеза абсцизовой кислоты (АБК) [9]. Так, мутант *gin1* (*glucose insensitive 1*) аллелен мутанту *aba2* (*abscisic acid insensitive 2*) и несет дефект гена, кодирующего один из ферментов биосинтеза АБК; мутант *gin5* (*glucose insensitive 5*) аллелен мутанту *aba3* (*abscisic acid 3*), также имеющему нарушение биосинтеза АБК; мутант *sis5* (*sucrose insensitive 5*) аллелен мутантам *sun6* (*sucrose uncoupled 6*), *isi3* (*impaired sucrose induction 3*), *gin6* (*glucose insensitive 6*) и *abi4* (*abscisic acid insensitive 4*), все эти мутанты несут дефекты гена *ABI4*, кодирующего одноименный транскрипционный фактор [24]. При повышении уровня глюкозы в клетках растений запускается НХК1-опосредованная индукция синтеза АБК, которая вызывает угнетение деления клеток и остановку развития проростков арабидопсиса [25]. Взаимодействие регуляторных путей, опосредуемых глюкозой и АБК, активно осуществляется на ранних стадиях развития проростков через прямой контроль экспрессии генов, ответственных за фотоавтотрофное развитие, прорастание и фотосинтез [26]. Одним из компонентов, участвующих в передаче сигналов от АБК, является транскрипционный фактор *ABI4*. Экспрессия гена *ABI4* повышается при увеличении содержания как АБК, так и глюкозы, а также при различных стрессах, которые также индуцируют биосинтез АБК [27].

Подтверждено участие *ABI4* в передаче митохондриально-ядерных сигналов у растений. При действии ротенона (ингибитора дыхательно-

го комплекса I) у растений арабидопсиса экотипа происходит индукция ядерного гена *АОХ1А*, продукт которого (альтернативная оксидаза дыхательной цепи) локализован в митохондриях. У мутантов *abi4* такой индукции не происходит. Показано, что белок *ABI4* связывается с регуляторными элементами, расположенными в промоторной области гена альтернативной оксидазы *АОХ1А* [28]. Эти данные указывают на непосредственное участие транскрипционного фактора *ABI4* в передаче митохондриально-ядерных сигналов при нарушении работы митохондриальной электрон-транспортной цепи [28, 29].

Можно отметить тесное пересечение регуляторных путей, опосредуемых глюкозой и АБК, с путями, опосредуемыми фитогормоном этиленом. Мутантные линии арабидопсиса, нечувствительные к этилену (*etr1-1*, *ein2* и *ein3-1*), являются гиперчувствительными к действию глюкозы. Линии *eto1-1* (*ethylene overproduction 1*) и *ctr1-1* (*constitutive ethylene triple response 1*) с усиленным биосинтезом этилена не имеют задержки роста при выращивании на среде с 6% глюкозой [11, 30].

Обработка проростков фитогормоном цитокинином вызывает стимуляцию роста гипокотилия у мутантов *gin2-1* по сравнению с растениями дикого типа, что позволяет предположить, что причиной этого может служить повышенная чувствительность мутантов *gin2-1* к действию данного фитогормона. Следует отметить, что действие цитокинина также отменяет задержку в раннем развитии проростков экотипа, выращенных на среде с 6%-й глюкозой, что указывает на подавление путей передачи сигналов с участием НХК1. Однако повышение уровня цитокинина в организме растений активно стимулирует синтез фитогормона этилена (антагонист сигналов с участием глюкозы), что позволяет предположить роль цитокинина как посредника в вышеописанных процессах [3, 11].

НХК1-зависимые регуляторные пути стимулируют старение растений. Сверхэкспрессия гена *НХК1* арабидопсиса приводит к усилению процессов, связанных со старением, в то время как мутанты *gin2-1* проявляют существенную задержку старения [3, 31]. Следует отметить, что отсутствие НХК1 у этих мутантов полностью не отменяет действие экзогенных сахаров на стимуляцию процессов старения, что указывает на потенциальное участие других типов сахаропосредованных сигналов.

РОЛЬ SNRK1-ОПОСРЕДОВАННЫХ СИГНАЛОВ В АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К ДЕФИЦИТУ ЭНЕРГИИ

Консервативная гетеротримерная протеинкиназа SnRK1 – важный регулятор процессов метаболизма и клеточного гомеостаза у растений [1]. Она является одним из центральных

компонентов-переключателей процессов, направленных на балансирование клеточной энергии. Передача сигналов с участием белкового комплекса SnRK1 у растений осуществляется посредством привлечения большого числа других белков-переносчиков. Запуск каскада сигналов с участием SnRK1 происходит при снижении уровня эндогенных сахаров, которые в норме репрессируют активность этой киназы. Активация SnRK1 направлена на повышение уровня растворимых сахаров в клетке, что достигается посредством усиления реакций катаболизма, репрессии реакций анаболизма, но одновременно активации фотосинтеза и глюконеогенеза [6]. SnRK1-опосредованная регуляция реализуется с участием различных транскрипционных факторов (семейств bZIP, NAC и FUS) [32].

SnRK1 – это мультисубъединичный комплекс, состоящий из трех субъединиц: α -субъединица является двухкомпонентной и состоит из киназного и регуляторного доменов, β - и γ -субъединицы являются регуляторными. Каждый тип субъединиц включает несколько подтипов ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и т.д.). В зависимости от подтипа α -субъединицы семейства SnRK1 включает подсемейства SnRK1 $\alpha 1$ /SnRK1 $\alpha 2$ /SnRK1 $\alpha 3$ (также именуемые SnRK1.1/SnRK1.2/SnRK1.3, AKIN $\alpha 1$ /AKIN $\alpha 2$ /AKIN $\alpha 3$, KIN10/KIN11/KIN12 или AKIN10/AKIN11/AKIN12). Киназный домен α -субъединицы содержит участок, называемый T-loop и несущий высококонсервативный аминокислотный остаток треонина, который локализуется для каждого типа α -субъединицы в специфическом положении этого белкового комплекса. Фосфорилирование этих треониновых остатков запускает киназную активность SnRK1 [33].

В 2007 г. было установлено, что инактивация двух субъединиц SnRK1 – SnRK1 $\alpha 1$ /KIN10 и SnRK1 $\alpha 2$ /KIN11 (*kinase10/11*), обладающих каталитической активностью, приводит к нарушению функционирования SnRK1, остановке роста и развития проростков арабидопсиса [6]. Экспрессия многих генов, продукты которых участвуют в процессах катаболизма и анаболизма, подвержена регуляции с участием KIN10 и KIN11. На молодых листьях и цветках арабидопсиса показано, что киназы GRIK1/SnAK1 и GRIK2/SnAK2 (*geminivirus Rep interacting kinase* или *SnRK1-activating kinase*) активируют SnRK1 посредством фосфорилирования субъединиц KIN10 и KIN11. Двойной мутант *SnAK1-SnAK2* по генам *GRIK1* и *GRIK2*, полученный методом инсерционного мутагенеза, способен к цветению, но не способен давать семена [34]. Нарушение работы любой из этих киназ вызывает нарушение фосфорилирования SnRK1, что указывает на их участие в регуляции работы SnRK1. KIN10 участвует в хлоропластно-ядерной регуляции экспрессии генов [35].

В 2018 г. было показано, что регуляторная субъединица SnRK1 KIN γ взаимодействует с

HXK1 арабидопсиса, подавляя ее регуляторную функцию. Поскольку экспрессия гена *KIN γ* индуцируется в темноте, можно предположить, что эта субъединица участвует в передаче сигналов, возникающих в ответ на дефицит углеводов, возникающий при долгом отсутствии фотосинтеза [36].

SnRK1-опосредованные сигналы принимают участие в регуляции метаболизма крахмала. Растения картофеля, содержащие сверхэкспрессирующие гены SnRK1-киназного комплекса, имели повышенную экспрессию генов сахаросинтазы и глюкозо-1-фосфатаденилтрансферазы (продукты которых участвуют в синтезе крахмала), что приводило к возрастанию содержания крахмала в клубнях. Необходимость SnRK1 для экспрессии генов α -амилазы (фермент гидролиза крахмала) в условиях углеводного голодания у эмбрионов риса и пшеницы указывает на роль SnRK1 в регуляции синтеза и распада крахмала [37].

СИГНАЛЫ, ОПОСРЕДУЕМЫЕ TOR-КИНАЗОЙ, КАК АНТАГОНИСТЫ SNRK1-СИГНАЛОВ

TOR (*Target of Rapamycin*) – это серин/треонинная протеинкиназа, являющаяся одним из ключевых регуляторов метаболизма. Эволюционно консервативная TOR-опосредованная регуляция присутствует у дрожжей, животных и растений [38]. Гены, кодирующие TOR-киназы, были обнаружены в геноме всех отсекументированных видов растений и водорослей.

У животных и дрожжей TOR-киназа представлена в виде двух высокомолекулярных комплексов, называемых TORC1 и TORC2, структура которых хорошо изучена [39]. В геноме арабидопсиса отсутствуют последовательности, гомологичные компонентам комплекса TORC2, однако, имеются гомологи TORC1 и два TOR-взаимодействующих комплекса – LST8 и RAPTOR [40], что позволяет рассматривать эти белки в качестве основной консервативной части TOR-опосредованной регуляции, распространенной у растений, животных и дрожжей.

В отличие от млекопитающих или дрожжей, у растений на данный момент выявлено лишь небольшое число физиологических процессов, которые регулируются TOR-киназой. Прямые мишени TORC1-опосредуемых сигналов – рибосомальная киназа S6 (S6K) и белок TAP46. У дрожжей S6K участвует в регуляции размера клеток и в развитии старения. Предполагается, что S6K у арабидопсиса ограничивает деление клеток и их рост при дефиците сахаров. Установлено, что PP2A, регуляторная субъединица белка TAP46 арабидопсиса, фосфорилируется с участием TORC1. При нарушении структуры белка TAP46 происходит снижение активности ферментов ассимиляции нитратов, например,

нитратредуктазы, что указывает на роль TOR в регуляции метаболизма азота у растений [38]. При азотном голодании снижение активности TOR запускает эндоцитоз и деградацию узкоспецифических транспортеров, которые затем заменяются на транспортеры более широкой специализации, способные вовлекать большее число молекул, являющихся потенциальным источником энергии [39].

Глюкоза может активировать TOR посредством деактивации SnRK1. TOR-киназа активируется при высоком уровне питательных веществ и запускает связанные с ростом энергоемкие процессы, такие как трансляция, пролиферация клеток, реакции анаболизма [41]. Установлено, что у арабидопсиса TOR-сигналы являются главными медиаторами, связанными с прорастанием [12]. Для смещения от гетеротрофного к фотоавтотрофному типу роста у проростков арабидопсиса TOR-сигналы, опосредованные глюкозой, активируют большое число генов, участвующих в клеточном цикле и анаболических процессах, и подавляют гены, ответственные за катаболизм. Мутанты *raptor1* практически не прорастают, имеют пониженную устойчивость к стрессам [42]. TOR-опосредуемые сигналы действуют сходно с T6P, являясь антагонистами SnRK1-сигналинга. Доказано, что у млекопитающих и дрожжей при дефиците питательных веществ аналоги SnRK1 ингибируют активность компонентов комплекса TOR [30]. Таким образом, сигналы SnRK1 и TOR действуют по принципу антагонистов. Предполагается, что KIN10 в составе SnRK1 фосфорилирует RAPTOR, деактивируя TOR-систему [36]. По-видимому, это система контроля степени энергии функционирует у растений на уровне белков-переключателей анаболических и катаболических клеточных процессов. Несмотря на вовлеченность TOR- и SnRK1-сигналов в регуляцию многих метаболических процессов, невозможно точно определить все компоненты передачи этих регуляторных путей. Очевидно, что эти две системы иницируют разнонаправленные сигналы и не функционируют одновременно.

Установлена роль TOR-сигналов в биогенезе рибосом у растений, дрожжей и млекопитающих. Активируемые глюкозой TOR-сигналы приводят к усилению экспрессии более сотни генов арабидопсиса, кодирующих белки рибосом, а также их факторы сбора инициации и элонгации [43, 44]. Кроме того, экспрессия этих генов репрессирована сигналами с участием KIN10, которая активируется при голодании или стрессе и подавляется глюкозой [45]. Эти данные еще раз подтверждают антагонизм между сигналами TOR и SnRK1.

СИГНАЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ ТРЕГАЛОЗЫ И T6P

Трегалозо-6-фосфат (T6P), предшественник

трегалозы, синтезируется из глюкозо-6-фосфата и UDP-глюкозы с участием трегалозо-6-фосфат-синтазы. Молекулы T6P служат сигналом повышения уровня эндогенных сахаров [37]. Синтез T6P в ответ на повышение уровня эндогенной сахарозы поддерживает процессы роста клеток через стимулирование синтеза различных компонентов клеточных стенок, а также приводит к взаимодействию с сигналами, опосредуемыми ауксинами и светозависимой регуляцией [46]. При низком уровне T6P происходит задержка роста растений ввиду угнетения биосинтетических процессов [47].

Получены данные о практической значимости трегалозы при ее использовании в борьбе с мучнистой росой (*Blumeria graminis*) у пшеницы. Обработка трегалозой зараженных проростков пшеницы стимулирует экспрессию защитных генов в ответ на стресс, что приводит к активации специфической защитной реакции и повышает устойчивость растения [37].

Важным моментом сахаропосредованной регуляции является взаимодействие между сигналами T6P и SnRK1 [48]. Установлено, что T6P-сигналы ингибируют активность SnRK1, что приводит к активации синтетических реакций, стимулирует анаболические реакции в организме [11]. Однако детальный механизм этого типа взаимодействий требует дальнейшего изучения.

У арабидопсиса повышение уровня T6P приводит к накоплению антоцианов на поздних стадиях развития листьев. При понижении уровня T6P уровень антоцианов снижается. Растения арабидопсиса с «выключенными» генами *kin10* и *kin11* также имеют повышенное содержание антоцианов в листьях и демонстрируют раннее старение в условиях постоянной освещенности, в то время как у трансгенных растений с повышенным уровнем экспрессии генов *kin10* и *kin11* старение замедляется [49]. Интересно отметить, что в стареющих листьях растения SnRK1 не ингибируется T6P, возможно, по причине отсутствия соответствующих промежуточных сигналов [21]. T6P накапливается при развитии процессов старения. Трансгенные растения арабидопсиса, экспрессирующие бактериальный фермент TPP (T6P-фосфотаза, катализирует превращение T6P в трегалозу), имеют сниженное содержание T6P и проявляют признаки отмены старения в виде отмены пожелтения листьев, снижения экспрессии генов-маркеров старения и отсутствие накопления антоцианинов [50].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У растений на сегодняшний день известно большое число различных регуляторных путей, протекающих с участием сахаров в качестве сигнальных молекул. Механизмы такой регуляции эволюционно консервативны для всех эукариот. Часть компонентов этой большой и сложной сети

сигналов остается не до конца изученной, поэтому исследования в этом направлении не теряют своей актуальности. Дальнейшие исследования позволяют установить новые точки пересечения этих сигнальных путей, выявить их взаимосвязь, что позволит понять весь механизм передачи сахаропосредуемых сигналов. В частности, предстоит выяснить, какие именно промежуточные молекулы действуют на внутриклеточном, межклеточном и организменном уровнях. Наконец, какие именно молекулы лежат во всех пересечениях регуляторных путей между TOR, SnRK1 и HXK1, как именно они действуют с учетом тканеспецифичности у разных видов растений. Вполне возможно, что в ближайшее время будут открыты новые компоненты и новые сахаропосредованные пути регуляции как экспрессии генов, так и непо-

средственно метаболизма у растений. Будет получена дополнительная информация о пересечении энергетических и стресс-сигналов у растений через взаимоисключающие функции SnRK1 и TOR-киназ, участвующих в регуляции транскрипции, трансляции и общего метаболизма в ответ на сигналы от гормонов, циркадных ритмов, патогенов, изменения уровня питательных веществ и сигналов из внешней среды. Более детальное изучение особенностей передачи сигналов с участием сахаров представляет большой интерес в связи с исключительной важностью этих сигналов для адаптации растений к изменяющимся условиям окружающей среды и, как следствие, для обеспечения их высокой биологической продуктивности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Smeeckens S., Ma J., Hanson J., Rolland F. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth // *Current Opinion in Plant Biology*. 2010. Vol. 13. Issue 3. P. 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.002>
2. Matsoukas I.G. Interplay between sugar and hormone signaling pathways modulate floral signal transduction // *Frontiers in Genetics*. 2014. Vol. 5. P. 218. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00218>
3. Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.-H., Liu Y.-X., et al. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling // *Science*. 2003. Vol. 300. Issue 5617. P. 332–336. <https://doi.org/10.1126/science.1080585>
4. Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms // *Annual Review of Plant Biology*. 2006. Vol. 57. P. 675–709. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441>
5. Van Dijken A.J., Schluepmann H., Smeeckens S.C. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering // *Plant Physiology*. 2004. Vol. 135. Issue 2. P. 969–977. <https://doi.org/10.1104/pp.104.039743>
6. Baena-Gonzalez E., Rolland F., Thevelein J.M., Sheen J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling // *Nature*. 2007. Vol. 448. Issue 7156. P. 938–942. <https://doi.org/10.1038/nature06069>
7. Schluepmann H., van Dijken A., Aghdasi M., Wobbes B., Paul M., Smeeckens S. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation // *Plant Physiology*. 2004. Vol. 135. Issue 2. P. 879–890. <https://doi.org/10.1104/pp.104.039503>
8. Häusler R.E., Heinrichs L., Schmitz J., Flügge U.-I. How sugars might coordinate chloroplast and nuclear gene expression during acclimation to high light intensities // *Molecular Plant*. 2014. Vol. 7. Issue 7. P. 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu064>
9. Ramon M., Rolland F., Sheen J. Sugar sensing and signaling // *The Arabidopsis Book*. 2008. Vol. 6. P. e0117. <https://doi.org/10.1199/tab.0117>
10. Bläsing O.E., Gibon Y., Günther M., Höhne M., Morcuende R., Osuna D., et al. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. 2005. Vol. 17. Issue 12. P. 3257–3281. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035261>
11. Sami F., Siddiqui H., Hayat S. Interaction of glucose and phytohormone signaling in plants // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019. Vol. 135. P. 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.11.005>
12. Xiong Y., McCormack M., Li L., Hall Q., Xiang C., Sheen J. Glc-TOR signaling leads transcriptome reprogramming and meristem activation // *Nature*. 2013. Vol. 496. Issue 7444. P. 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature12030>
13. Aguilera-Alvarado G.P., Sanchez-Nieto S. Plant hexokinases are multifaceted proteins // *Plant and Cell Physiology*. 2017. Vol. 58. Issue 7. P. 1151–1160. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx062>
14. Cho J.-I., Ryoo N., Eom J.S., Lee D.-W., Kim H.-B., Jeong S.-W., et al. Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors // *Plant Physiology*. 2009. Vol. 149. P. 745–759. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131227>
15. Zhang C., Han L., Slewinski T.L., Sun J., Zhang J., Wang Z.-Y., et al. Symplastic phloem loading in poplar // *Plant Physiology*. 2014. Vol. 166. Issue 1. P. 306–313. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245845>
16. Sheen J. Metabolic repression of transcription in higher plants // *The Plant Cell*. 1990. Vol. 2. P. 1027–1038. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.10.1027>
17. Cho Y.-H., Yoo S.-D., Sheen J. Glucose signaling through nuclear hexokinase1 complex in *Arabidopsis* // *Plant Signaling and Behavior*. 2007. Vol. 2. Issue 2. P. 123–124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.028>

18. Rottmann T., Fritz C., Sauer N., Stadler R. Glucose uptake via STP transporters inhibits *in vitro* pollen tube growth in a HEXOKINASE1-dependent manner in *Arabidopsis thaliana* // The Plant Cell. 2018. Vol. 30. Issue 9. P. 2057–2081. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00356>
19. Kim J. Sugar metabolism as input signals and fuel for leaf senescence // Genes and Genomics. 2019. Vol. 41. Issue 7. P. 737–746. <https://doi.org/10.1007/s13258-019-00804-y>
20. Miao H., Cai C., Wei J., Chang J., Qian H., Zhang X., et al. Glucose enhances indolic glucosinolate biosynthesis without reducing primary sulfur assimilation // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. Article no. 31854. <https://doi.org/10.1038/srep31854>
21. Huang W., Yu C., Hu J., Wang L., Dan Z., Zhou W., et al. Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2015. Vol. 112. P. 14984–14989. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511748112>
22. Rook F., Handingham S.A., Li Y., Bevan M.W. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression // Plant Cell & Environment. 2006. Vol. 29. Issue 3. P. 426–434. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01477.x>
23. Arenas-Huertero F., Arroyo A., Zhou L., Sheen J., Leon P. Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar // Genes and Development. 2000. Vol. 14. Issue 16. P. 2085–2096.
24. Koussevitzky S., Nott A., Mockler T.C., Hong F., Sachetto-Martins G., Surpin M., et al. Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression // Science. 2007. Vol. 316. Issue 5825. P. 715–719. <https://doi.org/10.1126/science.1140516>
25. Gregorio J., Hernandez-Bernal A.F., Cordoba E., Leon P. Characterization of evolutionarily conserved motifs involved in activity and regulation of the ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 transcription factor // Molecular Plant. 2014. Vol. 7. Issue 2. P. 422–436. <https://doi.org/10.1093/mp/sss132>
26. Giraud E., van Aken O., Ho L.H.M., Whelan J. The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of ALTERNATIVE OXIDASE1a // Plant Physiology. 2009. Vol. 150. Issue 3. P. 1286–1296. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139782>
27. Leon P., Gregorio J., Cordoba E. ABI4 and its role in chloroplast retrograde communication // Frontiers in Plant Science. 2013. Vol. 3. Article 304. 13 p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00304>
28. Tsai A.Y.-L., Gazzarrini S. Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture // Frontiers in Plant Science. 2014. Vol. 5. Article 119. 11 p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00119>
29. Swartzberg D., Hanael R., Granot D. Relationship between hexokinase and cytokinin in the regulation of leaf senescence and seed germination // Plant Biology. 2011. Vol. 13. Issue 3. P. 439–444. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00376.x>
30. Li L., Sheen J. Dynamic and diverse sugar signaling // Current Opinion in Plant Biology. 2016. Vol. 33. P. 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.018>
31. Crozet P., Margalha L., Confraria A., Rodrigues A., Martinho C., Adamo M., et al. Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases // Frontiers in Plant Science. 2014. Vol. 5. P. 190. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00190>
32. Glab N., Qury C., Guerinier T., Domenichini S., Crozet P., Thomas M., et al. The impact of *Arabidopsis thaliana* SNF1-related-kinase 1 (SnRK1)-activating kinase 1 (SnAK1) and SnAK2 on SnRK1 phosphorylation status: characterization of a SnAK double mutant // The Plant Journal. 2017. Vol. 89. Issue 5. P. 1031–1041. <https://doi.org/10.1111/tpj.13445>
33. Blanco N.E., Liebsch D., Diaz M.G., Strand A., Whelan J. Dual and dynamic intracellular localization of *Arabidopsis thaliana* SnRK1.1 // Journal of Experimental Botany. 2019. Vol. 70. Issue 8. P. 2325–2338. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz023>
34. Van Dingenen J., Vermeersch M., de Milde L., Hulsmans S., de Winne N., van Leene J., et al. The role of HEXOKINASE1 in *Arabidopsis* leaf growth // Plant Molecular Biology. 2019. Vol. 99. Issue 1-2. P. 79–93. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0803-0>
35. O'Hara L.E., Paul M.J., Wingler A. How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate // Molecular Plant. 2013. Vol. 6. Issue 2. P. 261–274. <https://doi.org/10.1093/mp/sss120>
36. Dong P., Xiong F., Que Y., Wang K., Yu L., Li Z., et al. Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in *Arabidopsis* // Frontiers in Plant Science. 2015. Vol. 6. Article 667. 15 p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00677>
37. Dobrenel T., Caldana C., Hanson J., Robaglia C., Vincentz M., Viet B., et al. TOR signaling and nutrient sensing // Annual Review of Plant Biology. 2016. Vol. 67. P. 261–285. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114648>
38. Cao P., Kim S.-J., Xing A., Schenck C.A., Liu L., Jiang N., et al. Homeostasis of branched-chain amino acids is critical for the activity of TOR signaling in *Arabidopsis* // eLife. 2019. Vol. 8. P. e50747. <https://doi.org/10.7554/eLife.50747>
39. Shinkawa H., Kajikawa M., Nomura Y., Ogura M., Sawaragi Y., Yamano T., et al. Algal protein kinase, triacylglycerol accumulation regulator1, modulates cell viability and gametogenesis in carbon/nitrogen imbalanced conditions // Plant Cell Physiology. 2019. Vol. 60. Issue 4. P. 916–930.

<https://doi.org/10.1093/pcp/pcz010>

40. Paul M.J., Jhurrea D., Zhang Y., Primavesi L.F., Delatte T., Schlupepmann H., et al. Upregulation of biosynthetic processes associated with growth by trehalose 6-phosphate // *Plant Signaling & Behavior*. 2010. Vol. 5. Issue 4. P. 386–392. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10792>

41. Delatte T.L., Sedijani P., Kondou Y., Matsui M., de Jon G.J., Somsen G.W., et al. Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway // *Plant Physiology*. 2011. Vol. 157. Issue 1. P. 160–174. <https://doi.org/10.1104/pp.111.180422>

42. Yadav U.P., Ivakov A., Feil R., Duan G.Y., Walther D., Giavalisco P., et al. The sucrose–trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P // *Journal of Experimental Botany*. 2014. Vol. 65. Issue 4. P. 1051–1068. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert457>

43. Cho Y.-H., Hong J.-W., Kim E.-C., Yoo S.-D. Regulatory functions of SnRK1 in stress-responsive gene expression and in plant growth and development // *Plant Physiology*. 2012. Vol. 158. Issue 4. P. 1955–1964. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189829>

44. Moreau M., Azzopardi M., Clement G., Dobrenel T., Marchive C., Renne C., et al. Mutations in the *Arabidopsis* homolog of LST8/GβL, a partner of the target of rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days // *The Plant Cell*. 2012. Vol. 24. Issue 2. P. 463–481. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.091306>

45. Xiong Y., McCormack M., Li L., Hall Q., Xiang C., Sheen J. Glucose-TOR signalling reprograms the

transcriptome and activates meristems // *Nature*. 2013. Vol. 496. Issue 7444. P. 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature12030>

46. Baena-Gonzalez E., Rolland F., Thevelein J.M., Sheen J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling // *Nature*. 2007. Vol. 448. Issue 7156. P. 938–942. <https://doi.org/10.1038/nature06069>

47. Karve A., Xia X., Moore B. *Arabidopsis* Hexokinase-Like1 and Hexokinase1 form a critical node in mediating plant glucose and ethylene responses // *Plant Physiology*. 2012. Vol. 158. P. 1965–1975. <https://doi.org/10.1104/pp.112.195636>

48. Kelly G., David-Schwartz R., Sade N., Moshelion M., Levi A., Alchanatis V., et al. The Pitfalls of Transgenic Selection and New Roles of AtHXK1: A high level of AtHXK1 expression uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from exogenous sugar // *Plant Physiology*. 2012. Vol. 159. Issue 1. P. 47–51. <https://doi.org/10.1104/pp.112.196105>

49. Wingler A., Delatte T.L., O'Hara L.E., Primavesi L.F., Jhurrea D., Paul M.J., et al. Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability // *Plant Physiology*. 2012. Vol. 158. P. 1241–1251. <https://doi.org/10.1104/pp.111.191908>

50. Salem M.A., Li Y., Wiszniewski A., Giavalisco P. Regulatory-associated protein of TOR (RAPTOR) alters the hormonal and metabolic composition of *Arabidopsis* seeds, controlling seed morphology, viability and germination potential // *The Plant Journal*. 2017. Vol. 92. Issue 4. P. 525–545. <https://doi.org/10.1111/tbj.13667>

REFERENCES

1. Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*. 2010;13(3):274–279. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.002>

2. Matsoukas IG. Interplay between sugar and hormone signaling pathways modulate floral signal transduction. *Frontiers in Genetics*. 2014;5:218. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00218>

3. Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W-H, Liu Y-X, et al. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*. 2003;300(5617):332–336. <https://doi.org/10.1126/science.1080585>

4. Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*. 2006;57:675–709. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441>

5. Van Dijken AJ, Schlupepmann H, Smeekens SC. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiology*. 2004;135(2):969–977. <https://doi.org/10.1104/pp.104.039743>

6. Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM,

Sheen J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. *Nature*. 2007;448(7156):938–942. <https://doi.org/10.1038/nature06069>

7. Schlupepmann H, van Dijken A, Aghdasi M, Wobbes B, Paul M, Smeekens S. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiology*. 2004;135(2):879–890. <https://doi.org/10.1104/pp.104.039503>

8. Häusler RE, Heinrichs L, Schmitz J, Flüge U-I. How sugars might coordinate chloroplast and nuclear gene expression during acclimation to high light intensities. *Molecular Plant*. 2014;7(7):1121–1137. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu064>

9. Ramon M, Rolland F, Sheen J. Sugar sensing and signaling. *The Arabidopsis Book*. 2008;6:e0117. <https://doi.org/10.1199/tab.0117>

10. Bläsing OE, Gibon Y, Günther M, Höhne M, Morcuende R, Osuna D, et al. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 2005;17(12):3257–3281. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035261>

11. Sami F, Siddiqui H, Hayat S. Interaction of

- glucose and phytohormone signaling in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;135:119–126. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.11.005>
12. Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, Sheen J. Glc-TOR signaling leads transcriptome reprogramming and meristem activation. *Nature*. 2013;496(7444):181–186. <https://doi.org/10.1038/nature12030>
13. Aguilera-Alvarado GP, Sanchez-Nieto S. Plant hexokinases are multifaceted proteins. *Plant and Cell Physiology*. 2017;58(7):1151–1160. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx062>
14. Cho J-I, Ryoo N, Eom JS, Lee D-W, Kim H-B, Jeong S-W, et al. Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. *Plant Physiology*. 2009;149:745–759. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131227>
15. Zhang C, Han L, Slewinski TL, Sun J, Zhang J, Wang Z-Y, et al. Symplastic phloem loading in poplar. *Plant Physiology*. 2014;166(1):306–313. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245845>
16. Sheen J. Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell*. 1990;2:1027–1038. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.10.1027>
17. Cho Y-H, Yoo S-D, Sheen J. Glucose signaling through nuclear hexokinase1 complex in *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior*. 2007;2(2):123–124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.028>
18. Rottmann T, Fritz C, Sauer N, Stadler R. Glucose uptake via STP transporters inhibits *in vitro* pollen tube growth in a HEXOKINASE1-dependent manner in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. 2018;30(9):2057–2081. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00356>
19. Kim J. Sugar metabolism as input signals and fuel for leaf senescence. *Genes and Genomics*. 2019;41(7):737–746. <https://doi.org/10.1007/s13258-019-00804-y>
20. Miao H, Cai C, Wei J, Chang J, Qian H, Zhang X, et al. Glucose enhances indolic glucosinolate biosynthesis without reducing primary sulfur assimilation. *Scientific Reports*. 2016;6. Article no. 31854. <https://doi.org/10.1038/srep31854>
21. Huang W, Yu C, Hu J, Wang L, Dan Z, Zhou W et al. Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112:14984–14989. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511748112>
22. Rook F, Handingham SA, Li Y, Bevan MW. Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant Cell & Environment*. 2006;29(3):426–434. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01477.x>
23. Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, Leon P. Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes and Development*. 2000;14(16):2085–2096.
24. Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, et al. Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*. 2007;316(5825):715–719. <https://doi.org/10.1126/science.1140516>
25. Gregorio J, Hernandez-Bernal AF, Cordoba E, Leon P. Characterization of evolutionarily conserved motifs involved in activity and regulation of the ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 transcription factor. *Molecular Plant*. 2014;7(2):422–436. <https://doi.org/10.1093/mp/sst132>
26. Giraud E, van Aken O, Ho LHM, Whelan J. The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of ALTERNATIVE OXIDASE1a. *Plant Physiology*. 2009;150(3):1286–1296. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139782>
27. Leon P, Gregorio J, Cordoba E. ABI4 and its role in chloroplast retrograde communication. *Frontiers in Plant Science*. 2013;3. Article 304. 13 p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00304>
28. Tsai AY-L, Gazzarrini S. Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5. Article 119. 11 p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00119>
29. Swartzberg D, Hanael R, Granot D. Relationship between hexokinase and cytokinin in the regulation of leaf senescence and seed germination. *Plant Biology*. 2011;13(3):439–444. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00376.x>
30. Li L, Sheen J. Dynamic and diverse sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 2016;33:116–125. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.018>
31. Crozet P, Margalha L, Confraria A, Rodrigues A, Martinho C, Adamo M, et al. Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5:190. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00190>
32. Glab N, Qury C, Guerinier T, Domenichini S, Crozet P, Thomas M, et al. The impact of *Arabidopsis thaliana* SNF1-related-kinase 1 (SnRK1)-activating kinase 1 (SnAK1) and SnAK2 on SnRK1 phosphorylation status: characterization of a SnAK double mutant. *The Plant Journal*. 2017;89(5):1031–1041. <https://doi.org/10.1111/tpj.13445>
33. Blanco NE, Liebsch D, Diaz MG, Strand A, Whelan J. Dual and dynamic intracellular localization of *Arabidopsis thaliana* SnRK1.1. *Journal of Experimental Botany*. 2019;70(8):2325–2338. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz023>
34. Van Dingenen J, Vermeersch M, de Milde L, Hulsmans S, de Winne N, van Leene J, et al. The role of HEXOKINASE1 in *Arabidopsis* leaf growth. *Plant Molecular Biology*. 2019;99(1-2):79–93. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0803-0>
35. O'Hara LE, Paul MJ, Wingler A. How do sugars regulate plant growth and development? *New*

insight into the role of trehalose-6-phosphate. *Molecular Plant*. 2013;6(2):261–274. <https://doi.org/10.1093/mp/sss120>

36. Dong P, Xiong F, Que Y, Wang K, Yu L, Li Z, et al. Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. 2015;6. Article 667. 15 p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00677>

37. Dobrenel T, Caldana C, Hanson J, Robaglia C, Vincentz M, Viet B, et al. TOR signaling and nutrient sensing. *Annual Review of Plant Biology*. 2016;67:261–285. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114648>

38. Cao P, Kim S-J, Xing A, Schenck CA, Liu L, Jiang N, et al. Homeostasis of branched-chain amino acids is critical for the activity of TOR signaling in *Arabidopsis*. *eLife*. 2019;8:e50747. <https://doi.org/10.7554/eLife.50747>

39. Shinkawa H, Kajikawa M, Nomura Y, Ogura M, Sawaragi Y, Yamano T, et al. Algal protein kinase, triacylglycerol accumulation regulator1, modulates cell viability and gametogenesis in carbon/nitrogen imbalanced conditions. *Plant Cell Physiology*. 2019;60(4):916–930. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz010>

40. Paul MJ, Jhurrea D, Zhang Y, Primavesi LF, Delatte T, Schluepmann H, et al. Upregulation of biosynthetic processes associated with growth by trehalose 6-phosphate. *Plant Signaling & Behavior*. 2010;5(4):386–392. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10792>

41. Delatte TL, Sedijani P, Kondou Y, Matsui M, de Jon GJ, Somsen GW, et al. Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. *Plant Physiology*. 2011;157(1):160–174. <https://doi.org/10.1104/pp.111.180422>

42. Yadav UP, Ivakov A, Feil R, Duan GY, Walther D, Giavalisco P, et al. The sucrose–trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *Journal of Experimental Botany*. 2014;65(4):1051–1068. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert457>

43. Cho Y-H, Hong J-W, Kim E-C, Yoo S-D.

Regulatory functions of SnRK1 in stress-responsive gene expression and in plant growth and development. *Plant Physiology*. 2012;158(4):1955–1964. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189829>

44. Moreau M, Azzopardi M, Clement G, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, et al. Mutations in the *Arabidopsis* homolog of LST8/G β L, a partner of the target of rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *The Plant Cell*. 2012;24(2):463–481. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.091306>

45. Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, Sheen J. Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*. 2013;496(7444):181–186. <https://doi.org/10.1038/nature12030>

46. Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. *Nature*. 2007;448(7156):938–942. <https://doi.org/10.1038/nature06069>

47. Karve A, Xia X, Moore B. *Arabidopsis* Hexokinase-Like1 and Hexokinase1 form a critical node in mediating plant glucose and ethylene responses. *Plant Physiology*. 2012;158:1965–1975. <https://doi.org/10.1104/pp.112.195636>

48. Kelly G, David-Schwartz R, Sade N, Moshelion M, Levi A, Alchanatis V, et al. The Pitfalls of Transgenic Selection and New Roles of AtHXK1: A high level of AtHXK1 expression uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from exogenous sugar. *Plant Physiology*. 2012;159(1):47–51. <https://doi.org/10.1104/pp.112.196105>

49. Wingler A, Delatte TL, O'Hara LE, Primavesi LF, Jhurrea D, Paul MJ, et al. Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. *Plant Physiology*. 2012;158:1241–1251. <https://doi.org/10.1104/pp.111.191908>

50. Salem MA, Li Y, Wiszniewski A, Giavalisco P. Regulatory-associated protein of TOR (RAPTOR) alters the hormonal and metabolic composition of *Arabidopsis* seeds, controlling seed morphology, viability and germination potential. *The Plant Journal*. 2017;92(4):525–545. <https://doi.org/10.1111/tbj.13667>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бельков Вадим Игоревич,

к.б.н., младший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ e-mail: anvad.irk@rambler.ru

Гарник Елена Юрьевна,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Vadim I. Belkov,

Cand. Sci. (Biology), Junior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ e-mail: anvad.irk@rambler.ru

Elena Yu. Garnik,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology

и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: elga74@yandex.ru

Тарасенко Владислав Игоревич,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: vslav@inbox.ru

Константинов Юрий Михайлович,
д.б.н., профессор, заведующий лабораторией
генетической инженерии растений,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация;
профессор,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Заявленный вклад авторов

Бельков В.И. – идея, написание статьи, обработка материала; Гарник Е.Ю. – идея, написание статьи, обработка материала; Тарасенко В.И. – научное редактирование текста; Константинов Ю.М. – научное руководство, научное редактирование текста.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

*Статья поступила в редакцию 13.04.2020;
одобрена после рецензирования 28.09.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: elga74@yandex.ru

Vladislav I. Tarasenko,
Ph.D. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: vslav@inbox.ru

Yuri M. Konstantinov,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Head of the laboratory
of Plant Genetic Engineering,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation;
Professor,
Irkutsk State University,
1, K. Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Contribution of the authors

Vadim I. Belkov – the idea of the article, writing the article, processing the material; Elena Yu. Garnik – the idea of the article, writing the article, processing the material; Vladislav I. Tarasenko – scientific text editing; Yuri M. Konstantinov – scientific management, scientific text editing.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

*The article was submitted 13.04.2020;
approved after reviewing 28.09.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 577.17

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-639-646>



Выявление соединения, антигеноподобного трийодтиронину, в клетках высших растений

© М.И. Гарипова, В.В. Федяев, Р.Г. Фархутдинов, Ю.М. Сотникова

Башкирский государственный университет, г. Уфа, Российская Федерация

Резюме: Общеизвестно метаболическое значение йодтиронинов в организме человека и животных. Для растений подобные соединения не описаны, однако, известны эффекты лекарственных растений на функцию щитовидной железы, что предполагает возможность присутствия соединений, аналогичных тиреоидным гормонам в клетках растений. Цель работы – выявление в клетках высших растений биологически наиболее активного представителя йодтиронинов – 3,5,3'-трийодтиронина. Методом иммуноферментного анализа показано, что в тканях корня и стебля проростков фасоли присутствует соединение, взаимодействующее с поликлональной сывороткой к 3,5,3'-трийодтиронину. Установлено, что в клетке выявленное соединение распределено неравномерно: в ядрах клеток его концентрация в 7–10 раз выше, чем в цитоплазме. Наряду с растениями фасоли исследованы 8 случайно выбранных растений, принадлежащих как к двудольным, так и однодольным растениям. Во всех исследованных растениях методом иммуноферментного анализа определено присутствие аналога 3,5,3'-трийодтиронина. Добавление экзогенного йодтиронина – тироксина (3,5,3',5'-тетрайодтиронина) при предпосевной обработке семян пшеницы достоверно повысило их всхожесть и привело к значимому увеличению соотношения массы побега к массе корня пятисуточных растений пшеницы при времени замачивания 6 и 12 ч. Вследствие обработки семян пшеницы тироксином в ядрах клеток стебля и корня пятидневных растений пшеницы произошло достоверное снижение концентрации выявленного соединения. Накопление в ядрах клеток и выявленные физиологические эффекты экзогенного 3,5,3',5'-тетрайодтиронина позволяют предположить, что в клетках высших растений данное соединение принимает участие в регуляции активности генов подобно тому, как это имеет место в клетках животных.

Ключевые слова: высшие растения, йодтиронины, тироксин, внутриклеточное распределение, всхожесть, соотношение масс побега и корня

Для цитирования: Гарипова М.И., Федяев В.В., Фархутдинов Р.Г., Сотникова Ю.М. Выявление соединения, антигеноподобного трийодтиронину, в клетках высших растений. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2020. Т. 10. N 4. С. 639–646. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-639-646>

Identification of a compound similar to triiodothyronine in the cells of higher plants

Margarita I. Garipova, Vadim V. Fedyaev, Rashit G. Farkhutdinov, Julia M. Sotnikova

Bashkir State University, Ufa, Russian Federation

Abstract: Iodothyronines play an important role in human and animal metabolism; however, their action in plant species is yet to be described. The known beneficial effects of medicinal plants on the function of the thyroid gland suggest the presence of compounds similar to thyroid hormones in plant cells. In this work, we aim to reveal the presence of 3,5,3'-triiodothyronine, the most active representative of iodothyronines, in the cells of higher plants. Using the method of immunoenzyme analysis, it was determined that the roots and stems of bean seedlings contain a compound interacting with a polyclonal serum to 3,5,3'-triiodothyronine. The identified compound is distributed unevenly within the cell: its concentration in the cell nuclei is 7–10 times higher than that in the cytoplasm. Along with bean plants, 8 randomly selected plants belonging to both dicotyledonous and monocotyledonous families were studied. In all the studied species, the presence of an analogue of 3,5,3'-triiodothyronine was determined using the method of immunoenzyme analysis. The use of exogenous iodothyronine – thyroxine (3,5,3',5'-tetraiodothyronine) – for the pre-sowing treatment of wheat seeds reliably improved their germination and led to a significant increase in the root-shoot mass ratio of five-day-old wheat seedlings under the soaking time of 6 and 12 hours. The treatment of wheat seeds with thyroxine led to a significant decrease in the concentration of the identified compound in the stem and root cell nuclei of five-day-old wheat seedlings. The revealed physiological and accumulation effects of exoge-

nous 3,5,3',5' tetraiodothyronine suggest its involvement in gene regulation in the cells of higher plants, similarly to that in animal cells.

Keywords: higher plants, iodothyronines, thyroxine, intracellular distribution, germination, root–shoot mass ratio

For citation: Garipova MI, Fedyayev VV, Farkhutdinov RG, Sotnikova JM. Identification of a compound similar to triiodothyronine in the cells of higher plants. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):639–646. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-639-646>

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на очевидные различия в молекулярных механизмах гормональной регуляции роста, развития и метаболизма растений и животных, за последние десятилетия накоплены факты, свидетельствующие о существовании у растений структурных аналогов многих гормонов животных [1–5].

В организме животных йодтиронины представлены 3,5,3'-трийодтиронином и 3,5,3'5'-тетрайодтиронином [6–9], которые подобно другим гидрофобным гормонам имеют внутриядерные рецепторы и принимают участие в регуляции транскрипции генов [10, 11]. Присутствие йодтиронинов в клетках растений до настоящего времени не описано, но отмечены эффекты лекарственных растений на функцию щитовидной железы [12–16]. Из лекарственных растений выделены соединения, способные взаимодействовать с ядерными тиреоидными рецепторами клеток животных [5]. Цель данного исследования – выявление в растительных тканях соединений, антигеноподобных 3,5,3'-трийодтирону, методом иммуноферментного анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом для исследования служили тканевые гомогенаты, фракции цитоплазмы и нуклеоплазмы, полученные из стебля и корня девяти видов растений.

Исследованы следующие растения: фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L., сорт Принто); бобы овощные (*Vicia faba* L., сорт Вировские); земляника садовая (*Fragaria ananassa*, сорт Фестивальная); банан райский (*Musa paradisiaca* L.); картофель (*Solanum tuberosum*, сорт Великан); морковь посевная (*Daucus carota* subsp. *Sativus*, сорт Фея); петрушка огородная (*Petroselinum crispum* L., сорт Богатырь); лук репчатый (*Allium cepa* L., сорт Фермер); пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L, сорт Саратовская 29). Морковь, петрушка, земляника, банан, картофель и лук выращены в открытом грунте. Использованы пятидневные проростки фасоли, бобов и пшеницы, выращенные методом гидропоники на дистиллированной воде. Семена пшеницы подвергали предпосевной обработке раствором L-тироксина в концентрациях 10, 100 и 1000 нг/л в течение 3, 6, 12 и 24 ч для каждой концентрации. В контроле семена выдерживали в дистиллированной воде при аналогичном времени

инкубации. В контроле и в каждом варианте эксперимента в 10 чашек Петри помещали по 50 зерновок и добавляли 15 мл раствора L-тироксина соответствующей концентрации. После окончания предпосевной обработки семена промывали в проточной воде в течение 1 мин и помещали в чашки Петри с добавлением 5 мл воды на сутки для проращивания в термостате при 28 °С без освещения. Проросшие семена выращивали методом гидропоники на дистиллированной воде до возраста 5 суток. В контроле и в каждом варианте эксперимента использовано по 10 чашек Петри.

Иммуноферментное определение концентрации трийодтиронина в пробах проводили с применением тест-систем «ТЗ общий-ИФА-БЕСТ» производства АО «Вектор-Бест» (Россия), основанных на методе одностадийного твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа с применением поликлональных антител к трийодтирону.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием ПО Statistica 6.0. Для определения концентрации исследуемых соединений в ядрах и цитоплазме клеток корня и стебля рассматривали по 30 экземпляров каждого вида растений, вычисляли среднее арифметическое значение показателя и абсолютные ошибки его определения. При сравнении концентрации исследуемых соединений использовали *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования в гомогенатах стебля и корня проростков фасоли методом иммуноферментного анализа показано присутствие соединений, конкурирующих с трийодтиронином за связывание с поликлональными антителами, использованными для сенсibilизации лунок стрипа. В гомогенатах стебля среднее значение концентрации выявленных соединений составило $11,4 \pm 0,41$ нмоль/л, в пробах, полученных из корней – $7,73 \pm 0,29$ нмоль/л ($n = 30$). Из литературы известно о существовании лекарственных растений, нормализующих состояние тиреоидной системы [12–16]. По данным авторов работы [5], соединения, с которыми связано лекарственное действие растений, не являются йодтиронидами и относятся к продуктам вторичного обмена. Если выявленные в нашем исследовании соединения также являются продуктами вторичного обмена исследованных

растений, то, вероятно, они локализируются в цитоплазматической части клетки. Для проверки этого предположения проведено определение концентрации выявленных соединений в ядрах и цитоплазме клеток проростков фасоли.

Как следует из гистограммы, приведенной на рис. 1, концентрация антигеноподобного трийодтиронины соединения в ядрах клеток достоверно выше, чем в цитоплазме ($T = 3,56$; $p = 0,041$ для клеток корня и $T = 4,19$; $p = 0,023$ для клеток стебля) и превышает ее в 6–10 раз. Из данных эксперимента следует, что распределение выявленного соединения между ядрами и цитоплазмой клеток проростков фасоли аналогично распределению 3,5,3'-трийодтиронина в клетках животных и человека [17].

Таким образом, существует вероятность того, что йодтиронины, или структурно близкие к ним соединения, в ядрах клеток фасоли принимают участие в регуляции активности генов подобно тому, как это происходит в животных клетках. Если это предположение верно, подобные соединения с высокой вероятностью должны присутствовать и в клетках других высших растений. Если же выявленные соединения являются продуктами вторичного обмена, они должны существовать не во всех растениях, а лишь в тех, которые отнесены к лекарственным на основании эффектов вторичных метаболитов на функцию щитовидной железы человека. Для проверки этого предположения проведено имму-

ноферментное определение 3,5,3'-трийодтиронина в ядрах клеток стебля и корня восьми случайно выбранных растений, относящихся как двудольным, так и однодольным растениям. Результаты определения представлены в табл. 1.

Как следует из данных, приведенных в табл. 1, во всех исследованных растениях обнаружены соединения, дающие положительную иммуноферментную реакцию, причем в каждом растении концентрация выявленных соединений в ядрах значительно превышает его концентрацию в цитоплазме. Соотношение исследуемых соединений в ядрах стебля и корня варьировало в зависимости от вида растения. Таким образом, показано, что выявленные соединения присутствуют не только в растениях семейства бобовых, но и в растениях других семейств двудольных и однодольных растений. Поскольку растения для исследования были выбраны случайно, существует высокая вероятность того, что они имеются у всех высших растений.

На основании того, что в ядрах клеток исследованных растений концентрация выявленного соединения более высокая, чем в цитоплазме, можно предположить, что оно принимает участие в регуляции активности генов. Одним из доказательств этого могло бы служить наличие эффекта экзогенных йодтиронинов на физиологические процессы растений. В табл. 2 приведены результаты эксперимента по изучению влияния обработки тироксином на всхожесть семян пшеницы.

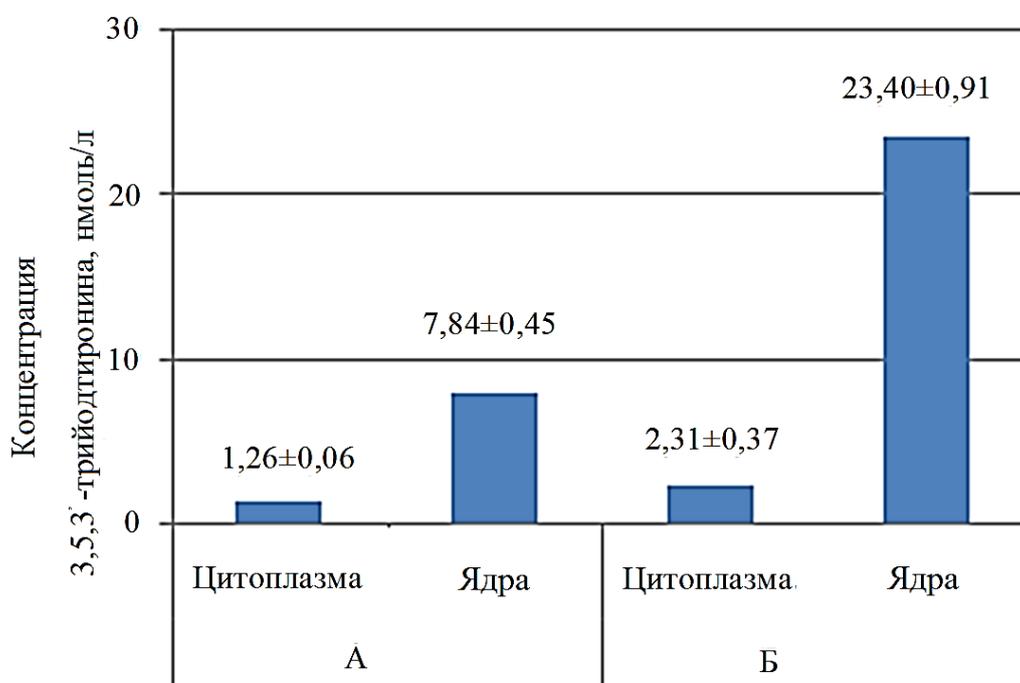


Рис. 1. Средняя концентрация антигеноподобного 3,5,3'-трийодтиронины соединения в цитоплазме и ядрах клеток проростков фасоли ($n = 30$). А – корни ($T = 3,56$; $p = 0,041$); Б – стебли ($T = 4,19$, $p = 0,023$)

Fig. 1. Average concentration of antigen-like 3,5,3'-iodothyronine substance in the cytoplasm and nuclei of bean sprouts cells ($n = 30$). А – roots ($T = 3,56$; $p = 0,041$); Б – steams ($T=4,19$, $p=0,023$)

Таблица 1. Среднее значение (\bar{M}) концентрации антигеноподобного 3,5,3'-йодтиронины соединения в ядрах клеток корня и стебля растений (нмоль/л)

Table 1. Antigen-like 3,5,3'-iodothyronine substance middle concentration (M^*) in the shoot and the root cell nuclei (nmol/l)

Вид растения, сорт	Корень		Стебель	
	Цитоплазма $M \pm m$	Ядра $M \pm m$	Цитоплазма $M \pm m$	Ядра $M \pm m$
Пшеница мягкая (<i>Triticum aestivum</i>), Саратовская 29	2,55±0,22	15,45±0,97	1,8±0,31	14,04±1,03
	$T = 5,48; p = 0,016$		$T = 6,04; p = 0,008$	
Картофель (<i>Solanum tuberosum</i>), Великан	3,1±0,84	11,53±0,79	1,59±0,21	14,57±0,95
	$T = 3,73; p = 0,048$		$T = 4,88; p = 0,026$	
Банан райский (<i>Musa paradisiaca</i> L.)	2,31 ± 0,21	13,85 ± 0,89	2,36 ± 0,47	19,77±1,12
	$T = 4,71; p = 0,031$		$T = 6,84; p = 0,008$	
Морковь посевная (<i>Daucus carota subsp. Sativus</i>), Фея	2,86±0,17	15,52±0,92	3,67±0,93	21,96±1,08
	$T = 7,13; p = 0,003$		$T = 8,56; p = 0,001$	
Земляника садовая (<i>Fragaria ananassa</i>), Фестивальная	9,2±0,23	28,12±1,04	9,81±0,5	25,43±1,31
	$T = 6,89; p = 0,007$		$T = 5,93; p = 0,016$	
Петрушка огородная (<i>Petroselinum crispum</i> L.), Богатырь	3,7±0,12	16,03±0,92	3,96±0,27	11,79±0,79
	$T = 4,11; p = 0,032$		$T = 3,49; p = 0,050$	
Лук репчатый (<i>Allium cepa</i> L.), Фермер	3,36±0,22	13,67±1,03	3,19±0,40	20,89±0,91
	$T = 3,87; p = 0,035$		$T = 4,62; p = 0,011$	
Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), Принто	1,26±0,06	7,84±0,45	2,31±0,37	23,4±0,90
	$T = 3,56; p = 0,041$		$T = 4,19; p = 0,023$	
Бобы овощные (<i>Vicia faba</i> L.), Вировские	1,19±0,61	20,6±1,14	2,99±0,24	19,37±0,98
	$T = 7,31; p = 0,005$		$T = 5,96; p = 0,012$	

Примечание. M – среднее арифметическое значение концентрации исследуемого соединения; $\pm m$ – абсолютная ошибка среднего значения; T – значение критерия Стьюдента; p – соответствующий уровень значимости.

Таблица 2. Всхожесть семян пшеницы, обработанных тироксином

Table 2. Germination of wheat seeds treated with thyroxine

Концентрация тироксина, нг/л	Время замачивания семян, ч			
	3 $M \pm m$	6 $M \pm m$	12 $M \pm m$	24 $M \pm m$
0	40,3±1,7	34,3±1,6	30,3±1,5	26±1,1
10	38,0±1,9	43,3±1,7	32±1,4	24,3±1,4
100	39,7±1,6	39,6±1,8	36,3±1,6	24±1,5
1000	40,3±1,9	40,3±1,9	35,3±1,4	26,3±1,6

Примечание. M – среднее арифметическое значение всхожести семян; $\pm m$ – абсолютная ошибка среднего значения.

В контроле при времени замачивания на 6 и 12 ч в среднем из 50 семян проросло 34,3±1,6 и 30,3±1,5 растений соответственно. Добавление тироксина при замачивании семян достоверно увеличило их всхожесть при данных периодах замачивания при всех испытанных концентрациях (см. табл. 2).

Экспериментально показано, что проращивание семян пшеницы в присутствии тироксина приводит к достоверному увеличению соотношения сырой массы побега и корня пятидневных растений пшеницы (рис. 2). В контроле соотношение масс стебля и корня (R) пятисуточных проростков пшеницы составило 1,5±0,07. Преинкубация семян с тироксином в течение 24 ч привела к значимому увеличению соотношения масс стебля и корня: при концентрации 10 нг/л показатель увеличился до 1,75±0,12, при концентрации 100 нг/л – до 2,10±0,19 (при сопоставлении с контролем $T = 4,65; p = 0,036$), при

1000 нг/л – до 1,8±0,15 (см. рис. 2). Таким образом, обработка семян при проращивании тироксином запускает в клетках биохимические процессы, вызывающие более быстрый рост стебля. Возможно, эффект связан с влиянием йодтиронина на биосинтез ауксинов и гиббереллинов [18] и/или ингибированием полярного транспорта индолилуксусной кислоты за счет структурного подобия тетраидтиронина и известного ингибитора полярного транспорта индолилуксусной кислоты – 2,3,5-трийодбензойной кислоты [19].

Показано, что обработка семян пшеницы тироксином при замачивании приводит к достоверному снижению концентрации антигеноподобного трийодтиронины соединения в ядрах пятисуточных растений пшеницы (табл. 3). Этот эффект ослабляется при увеличении концентрации тетраидтиронина до 100 и 1000 нг/л, возможно, в связи с превращением части тироксина в трийодтиронин.

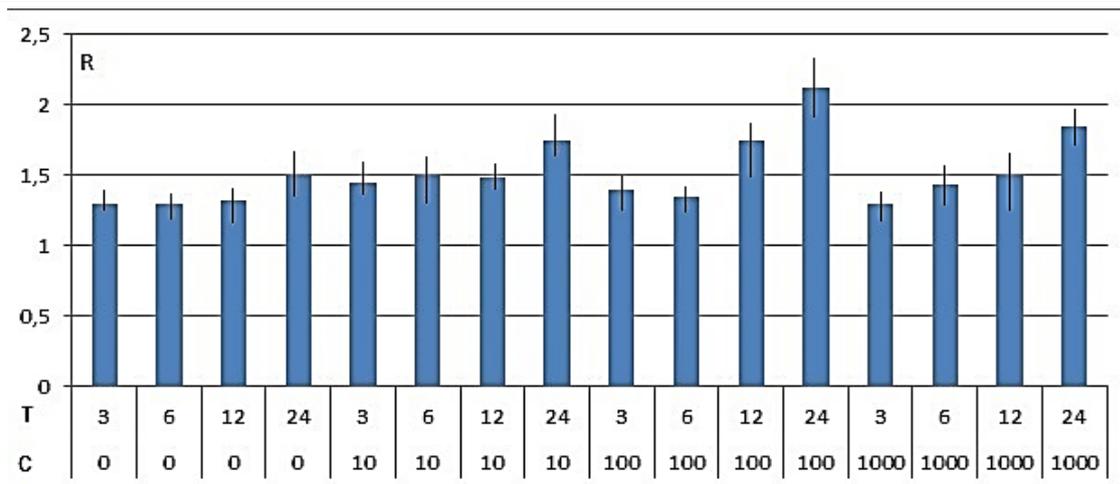


Рис. 2. Среднее значение ($n = 30$) соотношения сырой массы побега и корня (R) растений пшеницы, прошедших проращивание в присутствии тироксина.

T – время проращивания семян пшеницы, ч; C – концентрации тироксина, нг/л

Fig. 2. Average value ($n = 30$) of shoot and root raw mass ratio in wheat plants sprouted in thyroxine solution.

T – time of wheat seeds germination, h; C – thyroxine concentrations, ng/l

Таблица 3. Среднее значение концентрации (M^*) антигеноподобного 3,5,3'- йодтиронинового соединения в клеточных ядрах корня и стебля пятидневных растений пшеницы, обработанных тироксином

Table 3. Average concentration (M^*) of 3,5,3'-iodothyronine-like compound in the cell nuclei of the shoot and the root of five-day wheat plants treated by thyroxine

Концентрация тироксина, нг/л	Время замачивания семян, ч		
	3 $M \pm m$	6 $M \pm m$	12 $M \pm m$
0	10,26±0,98	16,8±1,11	18,20±1,35
10	9,53±0,86 $T = 3,01$ $p = 0,06$	11,35±1,03 $T = 5,62$ $p = 0,03$	5,94±0,67 $T = 6,58$ $p = 0,01$
100	12,82±1,07	10,39±0,98	10,01±0,98
1000	15,09±1,09	14,67±1,13	14,52±1,23

Примечание. M – среднее арифметическое значение концентрации исследуемого соединения; $\pm m$ – абсолютная ошибка среднего значения; T – значение критерия Стьюдента при сравнении с контрольными значениями; p – соответствующий уровень значимости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методом иммуноферментного анализа в клетках высших растений выявлено соединение, реагирующее с поликлональными антителами к 3,5,3'-трийодтирону. Показано, что выявленное соединение концентрируется в клеточном ядре. Это соединение определено в девяти случайно выбранных растениях, поэтому вероятно их присутствие в клетках всех высших растений. В эксперименте наблюдали эффект воздействия экзогенного йодтиронинового соединения на всхо-

жесть семян и развитие растений пшеницы. Отмеченные физиологические эффекты позволяют предположить, что йодтиронины вызывают биохимические процессы, подобные молекулярным механизмам прайминга семян под влиянием фитогормонов и регуляторов роста растений [20]. На основании полученных экспериментальных данных можно предположить, что выявленное соединение является регулятором роста и развития высших растений.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Mondal S., Mugesh G. Novel thyroid hormone analogues, enzyme inhibitors and mimetics, and their action // Molecular and Cellular Endocrinology. 2017. Vol. 458. P. 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.006>

2. Clouse S.D. Brassinosteroid Signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development // The

Plant Cell. 2011. Vol. 23. Issue 4. P. 1219–1230. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084475>

3. Куракин Г.Ф., Лопина Н.П., Бордина Г.Е. Анализ механизма действия жасмонатов методами вычислительной химии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018. Т. 21. N 4. С. 23–29. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-04-05>

4. Gancheva M.S., Malovichko Y.V., Poliushkevich L.O., Dodueva I.E., Lutova L.A. P // Russian Journal of Plant Physiology. 2019. Vol. 66. Issue 2. P. 171–189. <https://doi.org/10.1134/S1021443719010072>
5. Lima S.T.C., Merrigan T.L., Rodrigues E.D. Synthetic and plant derived thyroid hormone analogs. In: Ward L.S. (edited). *Thyroid and parathyroid diseases – new insights into some old and some new issues*. In Tech, 2012. Chapter 15. P. 221–235. <https://doi.org/10.5772/35134>
6. Kester M.H.A., de Mena R.M., Obregon M.J., Marinkovic D., Howatson A., Visser T.J., et al. Iodothyronine levels in the human developing brain: major regulatory roles of iodothyronine deiodinases in different areas // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003. Vol. 89. Issue 7. P. 3117–3128. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031832>
7. Bianco A.C., Maia A.L., da Silva W.S., Christoffolete M.A. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure // *Bioscience Reports*. 2005. Vol. 25. Issue 3-4. P. 191–208, <https://doi.org/10.1007/s10540-005-2885-6>
8. Marsili A., Zavacki A.M., Harney J.W., Larsen P.R. Physiological role and regulation of iodothyronine deiodinases: a 2011 update // *Journal of Endocrinological Investigation*. 2011. Vol. 34. Issue 5. P. 395–407. <https://doi.org/10.1007/BF3347465>
9. Giammanco M., di Liegro C.M., Schiera G., di Liegro I. Genomic and non-genomic mechanisms of action of thyroid hormones and their catabolite 3,5-diiodo-L-thyronine in mammals // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21. Issue 11. P. 4140–4149. <https://doi.org/10.3390/ijms21114140>
10. Flamant F., Baxter J.D., Forrest D., Refetoff S., Samuels H., Scanlan T.S., et al. International union of pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors // *Pharmacological Reviews*. 2006. Vol. 58. Issue 4. P. 705–711. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.3>
11. Anyetel-Anum C.S., Roggero V.R., Allison L.A. Thyroid hormone receptor localization in target tissues // *Journal of Endocrinology*. 2018. Vol. 237. Issue 1. P. R19–R34. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0708>
12. Gupta A., Wamankar S., Gidwani B., Kaur C.D. Herbal drugs for thyroid treatment // *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2016. Vol. 6. Issue 1. P. 62–70.
13. Bharthi V., Shubhashree M., Bhat S. Herbal approach to management of thyroid disease – a review // *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*. 2017. Vol. 3. Issue 1. P. 48–52.
14. Zeng X., Yuan Y., Wu T., Yan L., Su H. Chinese herbal medicines for hyperthyroidism // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2007. Issue 2. Article CD005450. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005450.pub2>
15. De Souza dos Santos M.C., Gonçalves C.F.L., Vaisman M., Ferreira A.C., de Carvalho D.P. Impact of flavonoids on thyroid function // *Food and Chemical Toxicology*. 2011. Vol. 49. Issue 10. P. 2495–2502. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.074>
16. Gonçalves C.F.L., de Freitas M.L., Ferreira A.C.F. Flavonoids, thyroid iodide uptake and thyroid cancer – a review // *International Journal of Molecular Science*. 2017. Vol. 18. Issue 6. P. 1247–1252. <https://doi.org/10.3390/ijms18061247>
17. Garipova M.I., Shigapova A.I., Farkhutdinov R.G., Fedyaev V.V., Sotnikova J.M., Yakupova A.B. The distribution of 3,5,3-triiodothyronine between the transport systems of blood and nuclei of the tissues // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2019. Vol. 37. Issue S1. P. 43–44. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1604468>
18. Bouquin T., Meier C., Foster R., Nielsen M.E., Mundy J. Control of specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid // *Plant Physiology*. 2001. Vol. 127. Issue 2. P. 450–458. <https://doi.org/10.1104/pp.010173>
19. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста и фитогормоны. М.: Наука, 1974. 253 с.
20. Hilker M., Schwachtje J., Baier M., Balazadeh S., Bäurle I., Geiselhardt S., et al. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system // *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2016. Vol. 91. Issue 4. P. 1118–1133 <https://doi.org/10.1111/brv.12215>

REFERENCES

1. Mondal S, Muges G. Novel thyroid hormone analogues, enzyme inhibitors and mimetics, and their action. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2017;458:91–104. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.006>
2. Clouse SD. Brassinosteroid Signal Transduction: From Receptor Kinase Activation to Transcriptional Networks Regulating Plant Development. *The Plant Cell*. 2011;23(4):1219–1230. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084475>
3. Kurakin GF, Lopina NP, Bordina GE. Analysis of the mechanism action of jasmonates using computational chemistry approaches. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*. 2018;21(4):23–29. (In Russian) <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-04-05>
4. Gancheva MS, Malovichko YV, Poliushkevich LO, Dodueva IE, Lutova LA. Plant peptide hormones. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2019;66(2):171–189. <https://doi.org/10.1134/S1021443719010072>
5. Lima STC, Merrigan TL, Rodrigues ED. *Synthetic and plant derived thyroid hormone analogs*. In: Ward LS. (ed.) *Thyroid and parathyroid diseases – new insights into some old and some new issues*.

In Tech, 2012. Chapter 15. P. 221–235. <https://doi.org/10.5772/35134>

6. Kester MHA, de Mena RM, Obregon MJ, Marinkovic D, Howatson A, Visser TJ, et al. Iodothyronine levels in the human developing brain: major regulatory roles of iodothyronine deiodinases in different areas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;89(7):3117–3128. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031832>

7. Bianco AC, Maia AL, da Silva WS, Christoffolete MA. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Bioscience Reports*. 2005;25(3-4):191–208. <https://doi.org/10.1007/s10540-005-2885-6>

8. Marsili A, Zavacki AM, Harney JW, Larsen PR. Physiological role and regulation of iodothyronine deiodinases: a 2011 update. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2011;34(5):395–407. <https://doi.org/10.1007/BF3347465>

9. Giammanco M, di Liegro CM, Schiera G, di Liegro I. Genomic and non-genomic mechanisms of action of thyroid hormones and their catabolite 3,5-diiodo-L-thyronine in mammals. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(11):4140–4149. <https://doi.org/10.3390/ijms21114140>

10. Flamant F, Baxter JD, Forrest D, Refetoff S, Samuels H, Scanlan TS, et al. International union of pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors. *Pharmacological Reviews*. 2006;58(4):705–711. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.3>

11. Anyetei-Anum CS, Roggero VR, Allison LA. Thyroid hormone receptor localization in target tissues. *Journal of Endocrinology*. 2018;237(1):R19–R34. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0708>

12. Gupta A, Wamankar S, Gidwani B, Kaur CD. Herbal drugs for thyroid.pdf. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2016;6(1):62–70.

13. Bharthi V, Shubhashree M, Bhat S. Herbal approach to management of thyroid disease – a review. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*. 2017;3(1):48–52.

14. Zeng X, Yuan Y, Wu T, Yan L, Su H. Chinese herbal medicines for hyperthyroidism. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2007;2. Article CD005450. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005450.pub2>

15. De Souza dos Santos MC, Gonçalves CFL, Vaisman M, Ferreira AC, de Carvalho DP. Impact of flavonoids on thyroid function. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49(10):2495–2502. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.074>

16. Gonçalves CFL, de Freitas ML, Ferreira ACF. Flavonoids, thyroid iodide uptake and thyroid cancer – a review. *International Journal of Molecular Science*. 2017;18(6):1247–1252. <https://doi.org/10.3390/ijms18061247>

17. Garipova MI, Shigapova AI, Farkhutdinov RG, Fedyayev VV, Sotnikova JM, Yakupova AB. The distribution of 3,5,3-triiodothyronine between the transport systems of blood and nuclei of the tissues. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2019;37(S1):43–44. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1604468>

18. Bouquin T, Meier C, Foster R, Nielsen ME, Mundy J. Control of Specific Gene Expression by Gibberellin and Brassinosteroid. *Plant Physiology*. 2001;127(2):450–458. <https://doi.org/10.1104/pp.010173>

19. Kefeli VI. *Natural growth inhibitors and phytohormones*. Moscow: Nauka; 1974. 253 p. (In Russian)

20. Hilker M, Schwachtje J, Baier M, Balazadeh S, Bäurle I, Geiselhardt S, et al. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2016;91(4):1118–1133. <https://doi.org/10.1111/brv.12215>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Гарипова Маргарита Ивановна,
д.б.н., доцент, профессор кафедры
биохимии и биотехнологии,
Башкирский государственный университет,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
✉ e-mail: margaritag@list.ru

Федяев Вадим Валентинович
к.б.н., доцент кафедры биохимии
и биотехнологии,
Башкирский государственный университет,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
e-mail: vadim.fedyayev@gmail.com

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Margarita I. Garipova,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Professor,
Biochemistry and Biotechnology Department,
Bashkir State University,
32, Zaki Validy St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
✉ e-mail: margaritag@list.ru

Vadim V. Fedyayev,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Biochemistry and Biotechnology Department,
Bashkir State University,
32, Zaki Validy St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
e-mail: vadim.fedyayev@gmail.com

Фархутдинов Рашит Габдулхаевич,
д.б.н., доцент, профессор кафедры биохимии
и биотехнологии,
Башкирский государственный университет,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
e-mail: frg2@mail.ru

Rashit G. Farkhutdinov,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Professor,
Biochemistry and Biotechnology Department,
Bashkir State University,
32, Zaki Validy St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
e-mail: frg2@mail.ru

Сотникова Юлия Михайловна,
старший преподаватель кафедры биохимии
и биотехнологии,
Башкирский государственный университет,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
e-mail: sotnikova-bashedu@mail.ru

Julia M. Sotnikova,
Senior Lecturer,
Biochemistry and Biotechnology Department,
Bashkir State University,
32, Zaki Validy St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
e-mail: sotnikova-bashedu@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*Статья поступила в редакцию 29.07.2020;
одобрена после рецензирования 30.09.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

*The article was submitted 29.07.2020;
approved after reviewing 30.09.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 579.26:579.22:579.64

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-647-656>



Особенности влияния штамма *Bacillus thuringiensis* 0271 на отдельные показатели неспецифической резистентности *Origanum vulgare* L. к стрессовым условиям

© А.В. Крыжко, У.М. Буджурова

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма
г. Симферополь, Российская Федерация

Резюме: Цель – изучить влияние штамма *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 0271 на биохимические показатели, определяющие неспецифическую устойчивость *Origanum vulgare* L. к неблагоприятным условиям внешней среды. Материалом исследований служила жидкая споровая культура штамма *B. thuringiensis* 0271, сортообразцы душицы обыкновенной: **100.1** с содержанием 75,5% карвакрола, **г-4** с содержанием 52,0% карвакрола, **№ 2** с содержанием 59,85% α -терпинеола, **№ 1** с преимущественным содержанием гермакрена D (21,5%) и β -кариофиллена (19,4%). Динамику сохранности спор штамма на поверхности листьев *O. vulgare* L. определяли по методике А.Г. Кольчевского, содержание пролина – по методике В.А. Храмова и Е.М. Агеевой. Содержание пигментов измеряли спектрофотометрически. Определение суммарного содержания фенольных соединений проводили по М.Н. Запрометову, аскорбиновой кислоты – по М.М. Окунцову, растворимых углеводов – фенольным методом. Установлено, что в листьях душицы сортообразцов **100.1** и **№ 1** через десять дней после обработки споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 количество хлорофиллов снижалось на 27,1 и 15,2% к контролю соответственно, а в листьях сортообразцов **г-4** и **№ 2** отмечали повышение их содержания на 91,4 и 72,7% соответственно. В листьях образца **г-4** на десятые сутки после обработки *B. thuringiensis* 0271 уменьшалось количество пролина и фенольных соединений в 4 раза. На десятые сутки после обработки штаммом 0271 сортообразца **100.1** наблюдалось уменьшение количества растворимых углеводов в 1,76 раза к контролю и фенольных соединений в 2,0 раза. Обработка культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 растений *O. vulgare* L. способствовала накоплению антиоксидантов в листьях образца **г-4** на десятые сутки на 14,5% к контролю.

Ключевые слова: *Origanum vulgare* L., *Bacillus thuringiensis*, пролин, хлорофилл, антиоксиданты, штамм

Благодарности: Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки России АААА19-119022590066-3 and АААА16-116022610119-2.

Для цитирования: Крыжко А.В., Буджурова У.М. Особенности влияния штамма *Bacillus thuringiensis* 0271 на отдельные показатели неспецифической резистентности *Origanum vulgare* L. к стрессовым условиям. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 4. С. 647–656. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-647-656>

Effects of *Bacillus thuringiensis* 0271 on individual indicators of nonspecific resistance of *Origanum vulgare* L. to stressful conditions

Anastasiia V. Kryzhko, Uryane M. Budzhurova

Research Institute of Agriculture of Crimea
Simferopol, Russian Federation

Abstract: In this paper, we aim to study the effect of the *Bacillus thuringiensis* strain var. *darmstadiensis* 0271 on the biochemical parameters of *Origanum vulgare* L., which determine its nonspecific resistance to unfavourable environmental conditions. The research materials were a liquid spore culture of *B. Thuringiensis* 0271 and the following oregano samples: **100.1** with 75.5% of carvacrol, **g-4** with 52.0% of carvacrol, **No. 2** with 59.85% of α -terpineol, **No. 1** with 21.5% of germacrene D and 19.4% of β -caryophyllene. The preservation of the strain

spores on the leaf surface of *Origanum vulgare* was determined using A.G. Kolchevsky's method. The proline content was determined by V.A. Khramov's and E.M. Ageeva's method, while the pigment content was measured spectrophotometrically. The total content of phenolic compounds, ascorbic acid and water-soluble carbohydrates was established according to the methods by M.N. Zaprometov, M.M. Okuntsov and M. Dubois, respectively. Ten days after treating the leaves of the **100.1** and **No. 1** oregano varieties with the spore culture of *B. Thuringiensis* 0271, the amount of chlorophylls decreased by 27.1 and 15.2% compared to the control, respectively. At the same time, the amount of chlorophylls increased by 91.4 and 72.7% in the leaves of the **g-4** and **No. 2** varieties, respectively. On the 10th day of the experiment, the amount of proline and phenolic compounds decreased by 4 times in the leaves of the **g-4** sample. Compared to the control, the **100.1** variety demonstrated a decrease in the amount of soluble carbohydrates and phenolic compounds by 1.76 and 2.0 times, respectively. On the 10th day of the experiment, the treatment of *O. vulgare* plants with *B. Thuringiensis* 0271 promoted the accumulation of antioxidants in the leaves of the **g-4** sample by 14.5% compared to the control.

Keywords: *Origanum vulgare* L., *Bacillus thuringiensis*, proline, chlorophyll, antioxidants, strain

Acknowledgments: The work was carried out within the framework of the state assignment of the RF Ministry of Education and Science AAAA19-119022590066-3 and AAAA16-116022610119-2.

For citation: Kryzhko AV, Budzhurova UM. Effects of *Bacillus thuringiensis* 0271 on individual indicators of nonspecific resistance of *Origanum vulgare* L. to stressful conditions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):647–656. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-647-656>

ВВЕДЕНИЕ

Душица обыкновенная (*Origanum vulgare* L.) хорошо известна с древнейших времен как лекарственное и ароматическое растение на всей территории Средиземноморья и в большинстве районов Евросибирского региона [1]. Она является перспективной культурой, продуцирующей вторичные метаболиты с функционально важными свойствами, применимые в пищевой промышленности, парфюмерии и косметологии (для производства отдушек мыла, лосьонов, духов и туалетной воды)¹. Эфирное масло душицы обладает антимикробной, цитотоксической, антиоксидантной и противогрибковой активностью [2]. В состав сырья *O. vulgare* L. входят многие эффективные антиоксиданты, такие как розмариновая кислота, кофейная кислота и различные флавоноиды [3, 4]. Эфирное масло данной культуры богато в основном карвакролом [5], обладает антибиотическими, гепатозащитными [6], антидиабетическими, антиапоптотическими [7–9] свойствами.

Перспективы возделывания *O. vulgare* L. в промышленных масштабах напрямую связаны с повышением экологической и агрономической устойчивости сортообразцов к неблагоприятным условиям внешней среды. Одним из приоритетных направлений в изучении особенностей формирования устойчивости растений к стрессовым факторам является изучение основных показателей неспецифической резистентности. Адекватное функционирование механизмов неспецифической устойчивости растений душицы может быть связано с перестройкой целого ряда метаболических процессов как основного, так и вторичного обмена, что в свою очередь может влиять на накопление хо-

зяйственно и агрономически ценных веществ, обуславливающих лекарственную и пищевую ценность культуры.

Одной из основных проблем возделывания душицы обыкновенной как ценной эфиромасличной и лекарственной культуры является защита от вредителя, относящегося к группе эриофиидных клещей. В качестве биоагента защиты душицы обыкновенной от *Eriophyes* sp. может быть использована бактерия *B. Thuringiensis*. Это широко известный энтомопатоген, традиционно использующийся для защиты сельскохозяйственных культур от листогрызущих насекомых и некоторых видов клещей. В настоящее время именно на его основе выпускается около 90–95% биопестицидов на мировом рынке. Данные спорообразующие бактерии способны формировать при споруляции параспоральные кристаллические включения белковой природы, обуславливающие главным образом их инсектицидную активность. *B. thuringiensis* в дозах, рекомендованных для биоконтроля насекомых-вредителей, совершенно безвредна для теплокровных животных, рыб, пчел и энтомофагов и может быть использована в защите лекарственных растений.

Бактерий рода *Bacillus* нередко используют для улучшения усвоения растениями питательных веществ, увеличения концентрации хлорофилла, пролина, а также стимуляции роста [10]. Так, установлено, что растения, инокулированные *B. subtilis*, *B. firmus*, *B. cereus*, *B. aryabhatai* и *B. mesonae*, улучшают ростовые характеристики и повышают скорость фотосинтеза [11–14]. Отмечено, что для *B. thuringiensis* также характерна стимуляция роста и устойчивости, связанная с синтезом индолилук-

¹Leung A.Y., Foster S. Leung's encyclopedia of common natural ingredients. Used in food, drugs and cosmetics. John Wiley & Sons Limited, 2003. 688 p. 3rd. 2009, 845 p.

сусной кислоты, продукцией сидерофоров, биологического фосфора и калия [15–18]. В последнее время установлено наличие у бактерий данной группы комплексных свойств. Доказаны антимикробные и антифунгальные свойства *B. thuringiensis* [19, 20]. Однако влияние данного энтомопатогена на обмен веществ и основные показатели физиологического состояния растений душицы мало исследовано.

Цель данной работы – оценить влияние штамма *B. thuringiensis* 0271 на основные биохимические показатели, определяющие неспецифическую устойчивость душицы обыкновенной к неблагоприятным условиям внешней среды, – фенольные соединения, аскорбиновую кислоту, пролин, растворимые углеводы, общего содержания антиоксидантов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работу проводили на базе лаборатории молекулярной генетики, протеомики и биоинформатики в сельском хозяйстве отдела сельскохозяйственной микробиологии Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма (НИИСХ Крыма). Материалом исследования послужил штамм *B. thuringiensis* var. *Darmstadiensis* 0271 Крымской коллекции микроорганизмов НИИСХ Крыма, зарегистрированной на сайте <http://www.ckp-rf.ru> под номером 507484. Жидкую споровую культуру штамма получали при культивировании бактерий на технологических качалках в питательной среде на основе кукурузного экстракта и глюкозы в колбах объемом 750 мл с 50 мл питательной среды. Для изучения влияния штамма *B. thuringiensis* 0271 на накопление протекторных соединений, антиоксидантов и пигментов фотосинтезирующего комплекса душицы растения обрабатывали жидкой споровой культурой с титром спор $0,4 \cdot 10^9$ в фазе бутонизации. Контролем служили растения, обработанные водой.

В исследованиях использовались следующие сортообразцы *O. vulgare* L.: **100.1** с содержанием 75,59% карвакрола, гибрид **г-4** с содержанием 52,04% карвакрола; **№ 2** с содержанием 59,85% α -терпинеола, образец **№ 1** с преимущественным содержанием гермакрена D (21,5%) и β -кариофиллена (19,4%). Выбор сортообразцов с высоким и повышенным содержанием карвакро-

ла обусловлен наличием в литературе большого количества сведений об антимикробном эффекте фенолов (тимол, карвакрола) даже в следовых количествах [21]. Также принимались во внимание антимикробные свойства α -терпинеола и других компонентов эфирного масла душицы. Исследования, касающиеся изучения фитонцидной активности образцов душицы на штаммы *B. thuringiensis* в зависимости от сроков вегетации, фитомассы и количественной оценки действия летучих фракций фитонцидов растения проводили в фенофазах: вегетативной, бутонизации и цветения. Выбор фаз обусловлен сроками активности вредителя и оптимальными сроками уборки сырья, которые в свою очередь зависят от динамики накопления эфирного масла в онтогенезе растений. Так, эриофиидным клещом (*Eriophyes* sp.) поражаются молодые побеги в фазе вегетативного развития. По литературным данным, максимальное количество эфирного масла у большинства представителей рода *Origanum*, как правило, накапливается в фазу цветения [22]. И поскольку кошение целесообразно проводить именно в фазу цветения, наши исследования завершились в данной фазе.

Определение количества спор и параспоральных включений *B. thuringiensis* 0271 на растениях душицы обыкновенной проводили методом микробиологического анализа смывов с листьев по А.Г. Кольчевскому². Содержание зеленых пигментов измеряли спектрофотометрически по методике В.Ф. Гавриленко, М.Е. Ладыгиной, Л.М. Хандобиной при длине волн 665 и 649 нм (хлорофиллы **а** и **в**) в общей спиртовой вытяжке на спектрофотометре СФ-2000³. Содержание пигментов в листьях душицы обыкновенной определяли в пересчете на единицу сырой массы листа, содержание пролина – спектрофотометрически в толуольной вытяжке при длине волны 490 нм по методике В.А. Храмова и Е.М. Агеевой [23]. Определение суммарного содержания фенольных соединений проводили в водных экстрактах при помощи индигокармина по М.Н. Запрометову⁴. Определение аскорбиновой кислоты проводили титрованием с 2,6-дихлорфенолиндофенолом по М.М. Окунцову⁵. Общее содержание растворимых углеводов в растениях определяли при помощи фенольных соединений⁶. Экстракцию антиоксидантов проводили в водно-этанольных экстрактах с детергентом мембран-

²Определение количества спор и параспоральных включений *Bacillus thuringiensis* на растениях и в почве: метод. указания / сост. А.Г. Кольчевский, А.Я. Лескова, К.Г. Хомякова и др. Л.: ВИЗР, 1984. 11 с.

³Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. М.: Высш. шк., 1975. 392 с.

⁴Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений (для биологических специальностей университетов). М.: Высш. шк., 1974.

⁵Окунцов М.М., Аксенова О.Ф., Вертоухова Г.С. Специальный практикум по биохимии и физиологии растений. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1974. 114 с.

⁶Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Analytical Chemistry. 1956. Vol. 28. Issue 3. P. 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

ных структур тритоном X-100 в течение 24 ч. Определение общего содержания антиоксидантов осуществляли по восстановлению хлорного железа(III) до хлористого железа(II), количество которого устанавливалось по интенсивности окраски при добавлении о-фенантролина⁷.

Достоверность разницы между опытными и контрольными вариантами оценивали по критерию Стьюдента. В работе использовали современные методы статистических исследований с применением ПО Microsoft Excel и ППП Statistica 7 [24].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Воздействие штамма *B. thuringiensis* 0271 на физиологические показатели душицы обыкновенной может быть связано с сохранностью спор на листьях. Сохранность биоинсектицида на основе споровой культуры штамма *B. thuringiensis* на листьях растения зависит от целого ряда причин. Главными среди них традиционно считают инсоляцию, температуру, влажность и осадки. Ультрафиолетовое излучение инактивирует большинство бактерий [25]. Данный вопрос, в связи с климатическими особенностями, очень актуален для Республики Крым. Одним из безусловно важных факторов, влияющих на энтопатогенные микроорганизмы в биоценозе душицы обыкновенной, являются фитонциды и экстрактивные вещества растений. Принимая во внимание высокое содержание бактерицидных веществ – карвакрола, п-цимена, γ -терпинена и α -терпинеола в тканях сортообразцов, изучалась динамика сохранности штамма *B. thuringiensis* 0271 на листьях душицы обыкновенной.

В день постановки опыта и далее в течение 10 суток наблюдали безветренную солнечную погоду со средней температурой воздуха 23,1 °С и длительностью солнечного дня 10,6–12,6 ч (табл. 1). Согласно данным, полученным с метеостанции Симферополь, Россия, WMO_ID=33955 (rp5.ru <http://rp5.ru>) в период полевых исследований (выборка с 21.06.2018 г. по 02.07.2018 г.) регистрировали безоблачную погоду, осадков отмечено не было.

Анализ спор на поверхности листьев, проведенный через сутки после обработки, показал, что количество жизнеспособных спор штамма 0271 интенсивнее всего снижается на листьях сортообразцов **г-4** и **100.1** – в среднем более чем на 93,7–97,7% в сравнении с начальным количеством. Снижение количества спор на листьях сортообразцов **№ 1** и **№ 2** через сутки после обработки достигало лишь 60,6 и 76,7% соответственно. В течение трех последующих дней тенденция снижения количества спор штамма 0271 сохранялась довольно активно для всех сортообразцов (на 85,1–99,0%) за исключением **№ 1**, но уже к пятому дню уменьшилось на 96,1–99,0%, а к десятому дню – на 95,2–99,0% (см. табл. 1). Более интенсивное снижение количества спор на листьях сортообразцов **г-4** и **100.1** в первые трое суток могло быть связано с преимущественным содержанием карвакрола в их эфирном масле. Практически одинаково активное снижение количества спор штамма 0271 на листьях всех сортообразцов в более поздние сроки учета могло быть связано с интенсивной инсоляцией.

Таблица 1. Сохранность спор *B. thuringiensis* 0271 на листьях душицы обыкновенной (*O. vulgare* L.) после обработки

Table 1. Safety of *B. thuringiensis* 0271 spores on leaves after *O. vulgare* L. treatment

Сортообразец <i>Origanum vulgare</i> L.	Время после обработки, сут.	Число спор в расчете на 1 г листовой массы	Снижение количества спор, %	Среднесуточная температура, °С*	Общая облачность, %*
№ 1	День обработки	$1,8 \cdot 10^7$	–	26,1	облаков нет
	1-е	$7,2 \cdot 10^6$	60,6	24,1	облаков нет
	3-и	$2,0 \cdot 10^6$	72,2	20,0	облаков нет
	5-е	$3,9 \cdot 10^4$	98,1	25,4	10,0
	10-е	$2,7 \cdot 10^2$	99,3	20,3	облаков нет
№ 2	День обработки	$2,8 \cdot 10^7$	–	26,1	облаков нет
	1-е	$6,5 \cdot 10^6$	76,78	24,1	облаков нет
	3-и	$9,7 \cdot 10^5$	85,07	20,0	облаков нет
	5-е	$3,8 \cdot 10^4$	96,08	25,4	10,0
	10-е	$1,8 \cdot 10^3$	95,26	20,3	облаков нет
г-4	День обработки	$5,2 \cdot 10^7$	–	26,1	облаков нет
	1-е	$3,4 \cdot 10^6$	93,7	24,1	облаков нет
	3-и	$4,9 \cdot 10^5$	99,0	20,0	облаков нет
	5-е	$3,8 \cdot 10^5$	99,1	25,4	10,0
	10-е	$2,6 \cdot 10^2$	99,9	20,3	облаков нет
100.1	День обработки	$2,3 \cdot 10^7$	–	26,1	облаков нет
	1-е	$0,5 \cdot 10^6$	97,7	24,1	облаков нет
	3-и	$2,4 \cdot 10^5$	99,0	20,0	облаков нет
	5-е	$2,1 \cdot 10^5$	99,0	25,4	10,0
	10-е	$1,3 \cdot 10^2$	99,9	20,3	облаков нет

⁷Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Практикум по физиологии и биохимии растений: учеб. пособие. СПб.: ГИОРД, 2013. 352 с.

Неспецифическая устойчивость растений зависит от многих факторов, основными из которых являются: регуляция поглощения кислорода; содержание пролина как осмотически активного органического вещества, способствующего удержанию воды в клетке; повышение активности функции хлоропласт, сопровождающееся активизацией синтеза хлорофилла; синтез других протекторных соединений, таких как растворимые углеводы, аскорбиновая кислота и фенольные соединения. Важнейшим регулятором неспецифической устойчивости растений к неблагоприятным факторам являются антиоксиданты – антагонисты активных форм кислорода, позволяющие поддерживать растительный гомеостаз.

Одним из основных показателей, характеризующих устойчивость растений, является активность хлоропласт, обеспечивающая адекватный уровень энергообеспечения растительных клеток. В качестве одного из показателей физиологического состояния фотосинтетического аппарата было исследовано содержание хлорофилла в листьях душицы обыкновенной.

Было отмечено, что в листьях душицы сортообразца 100.1 и образца № 1, обработанных жидкой споровой культурой штамма 0271, через 10 дней после обработки снижалось количество хлорофилла на 27,1 и 15,2% к контролю соответственно (рис. 1). Напротив, в листьях душицы сортообразцов г-4 и № 2 через 10 дней после обработки отмечали повышение содержания хлорофилла на 91,4 и 72,7% соответственно. Однако результаты анализа, проведенного через 20 дней после обработки, свидетельствуют об отсутствии существенного влияния обработки на исследуемый показатель для всех сортообразцов.

Различные сортообразцы душицы обыкновенной при обработке листьев жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 различались по накоплению протекторных соединений, принадлежащих к разным химическим группам (табл. 2). Так, образцы № 1 и № 2 на 10-е сутки после обработки культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 показали увеличение содержания пролина и фенольных соединений в 1,6 раза по отношению к контролю. Тенденция к накоплению пролина и фенольных соединений сохранялась у сортообразца № 1 и на 20-е сутки после обработки. Наблюдали увеличение содержания пролина в 1,25 и фенольных соединений в 1,31 раз к контролю. Однако в эксперименте с обработанным образцом № 2 наблюдали уменьшение как аккумуляции пролина, так и фенольных соединений в 1,76 раз. Обработка штаммом *B. thuringiensis* 0271 не оказывала достоверного влияния на содержание растворимых углеводов и аскорбиновой кислоты в течение всего периода эксперимента. Исключение составил сортообразец № 2, при обработке которого наблюдали уменьшение содержания растворимых углеводов в 2,14 раз на 10-е сутки после обработки.

В листьях образца г-4 на 10-е сутки после обработки наблюдали снижение количества пролина в 4 раза и уменьшение количества фенольных соединений в 4 раза. На 20-е сутки содержание пролина и фенольных соединений в листьях душицы, обработанных жидкой споровой культурой *B. thuringiensis* 0271, находилось на уровне контроля. Штамм 0271 не оказывал достоверного влияния на накопление растворимых углеводов и аскорбиновой кислоты при обработке душицы обыкновенной образца г-4.

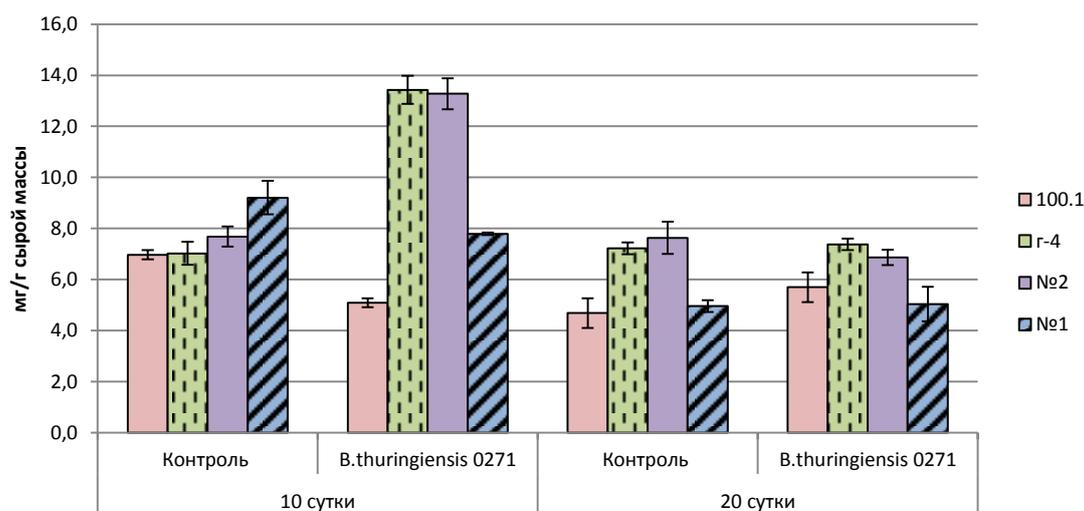


Рис. 1. Влияние штамма *B. thuringiensis* 0271 на содержание хлорофилла в листьях *O. vulgare* L. различных сортообразцов

Fig. 1. Influence of *B. thuringiensis* strain 0271 on chlorophyll content in *O. vulgare* L. leaves of various cultivars

Таблица 2. Содержание протекторных соединений в листьях *O. vulgare* L.
 Table 2. Protective compounds content in *O. vulgare* L. leaves

Вариант опыта	Пролин, мкг/г сырой массы	Растворимые углеводы, мкг/г сухой массы	Аскорбиновая кислота, мг/г сырой массы	Фенольные соединения, мкг/г сырой массы
Анализ на 10-е сутки после обработки				
№1	0,09±0,01	159,31±30,41	0,12±0,001	0,009±0,002
№1+ <i>B. thuringiensis</i> 0271	0,15±0,02	124,46±13,17	0,13±0,001	0,015±0,001
№2	0,05±0,001	219,20±20,62	0,16±0,001	0,005±0,0001
№2+ <i>B. thuringiensis</i> 0271	0,10±0,01	102,89±3,31	0,16±0,001	0,010±0,002
г-4	0,12±0,02	97,91±11,61	0,12±0,0008	0,012±0,002
г-4+ <i>B. thuringiensis</i> 0271	0,03±0,006	71,35±5,98	0,13±0,0008	0,003±0,0006
100.1	0,04±0,001	122,80±3,31	0,12±0,0008	0,004±0,0001
100.1+ <i>B. thuringiensis</i> 0271	0,03±0,001	69,70±2,87	0,13±0,0008	0,002±0,0001
Анализ на 20-е сутки после обработки				
№1	0,16±0,006	157,65±16,84	0,17±0,005	0,016±0,0006
№1+ <i>B. thuringiensis</i> 0271	0,20±0,01	142,71±20,43	0,17±0,004	0,021±0,002
№2	0,23±0,01	202,60±25,91	0,21±0,001	0,023±0,001
№2+ <i>B. thuringiensis</i> 0271	0,13±0,01	225,69±21,76	0,20±0,004	0,013±0,001
г-4	0,16±0,025	147,69±16,34	0,16±0,006	0,016±0,002
г-4+ <i>B. thuringiensis</i> 0271	0,20±0,01	127,78±22,32	0,18±0,0008	0,020±0,001
100.1	0,12±0,009	127,78±11,61	0,17±0,0014	0,013±0,0009
100.1+ <i>B. thuringiensis</i> 0271	0,17±0,02	106,20±6,63	0,17±0,003	0,017±0,003

На 10-у сутки после обработки штаммом 0271 образца душицы обыкновенной **100.1** наблюдали уменьшение количества растворимых углеводов в 1,7 раза к контролю и фенольных соединений в 2,0 раза. На 20-е сутки после обработки сохранялась тенденция к уменьшению количества растворимых углеводов – с 127,7 до 106,2 мкг/г (в 1,2 раза к контролю). Анализ на 10-е сутки эксперимента показал отсутствие достоверного влияния обработки на накопление пролина. Однако на 20-е сутки наблюдали увеличение его содержания в 1,4 раза. Обработка штаммом *B. thuringiensis* 0271 достоверного влияния на содержание аскорбиновой кислоты в листьях не оказывала.

Большинство окислительно-восстановительных реакций в живых организмах проходит с участием молекулярного кислорода и катализируются ферментами. Однако эти реакции не только регулируют рост и развитие, участвуют в защитных реакциях на неблагоприятные воздействия, заживление повреждений, но и могут являться спонтанными превращениями, приводящими к окислительным повреждениям важнейших биологических молекул. Равновесие и единство антиоксидантов и прооксидантов рассматривается как неотъемлемое условие поддержания внутренней среды живых клеток [26]. Изучаемая группа терпеноидных хинонов и токохроманолов,

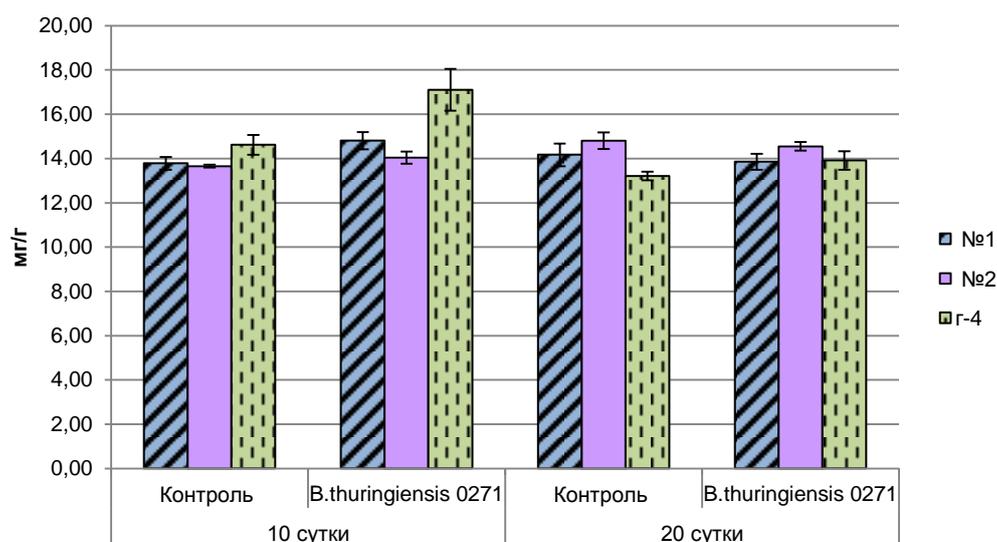


Рис. 2. Влияние штамма *B. thuringiensis* 0271 на содержание антиоксидантов в листьях *O. vulgare* L. различных сортов

Fig. 2. Influence of *B. thuringiensis* strain 0271 on the antioxidants content in *O. vulgare* L. leaves of various cultivars

в которую входят токоферолы, токотриенолы и жирорастворимые хиноны, является составной частью биомембран. Их антиоксидантная активность обусловлена способностью переходить в форму феноксильного радикала⁸.

Изучение влияния обработки жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 душицы обыкновенной различных сортообразцов показало, что существенное накопление антиоксидантов (на 14,5% к контролю) отмечали лишь в листьях образца **г-4** на 10-е сутки после обработки. Из всего вышесказанного можно заключить, что обработка культурой штамма *B. Thuringiensis* 0271 душицы обыкновенной не оказывает существенного влияния на естественно сложившиеся условия нормального метаболизма и свободнорадикального окисления.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлено, что в листьях душицы сортообразцов **100.1** и **№ 1** через 10 дней после обработки жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 снижалось количество хлорофиллов на 27,1 и 15,2% к контролю соответственно. Напротив, в листьях душицы сортообразцов **г-4** и **№ 2** через 10 дней после обработки отмечали повышение содержания хлорофилла на 91,4 и 72,7% соответственно. Однако через 20 дней после обработки существенного влияния штамма *B. thuringiensis* 0271 на исследуемый показатель для всех сортообразцов не отмечено.

Показано, что на сохранность спор штамма *B. thuringiensis* 0271, нанесенных на поверхность

листьев *O. vulgare* L., влияют как биотические, так и абиотические факторы. Интенсивное, на 93,7–97,7% в сравнении с начальным, снижение количества спор на листьях сортообразцов **г-4** и **100.1** в первые трое суток может быть связано с преимущественным содержанием карвакрола в их эфирном масле. Практически одинаково активное (на 96,1–99,0%) снижение количества спор штамма 0271 на листьях всех сортообразцов в более поздние сроки учета (5–10 суток) может быть связано с инсоляцией.

В образцах душицы **№ 1** и **№ 2** на 10-е сутки после обработки споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 было отмечено увеличение содержания пролина и фенольных соединений в 1,6 раза к контролю. При обработке культурой образца **№ 2** наблюдали уменьшение как аккумуляции пролина, так и фенольных соединений в 1,76 раз. В листьях образца **г-4** на 10-е сутки после обработки *B. thuringiensis* 0271 количество пролина и фенольных соединений уменьшилось в 4 раза. На 10-е сутки после обработки штаммом 0271 у образца душицы обыкновенной **100.1** наблюдали уменьшение количества растворимых углеводов в 1,76 раза к контролю, фенольных соединений – в 2,0 раза. Обработка штаммом *B. thuringiensis* 0271 достоверного влияния на содержание аскорбиновой кислоты в листьях *O. vulgare* L. не оказывала.

Показано, что обработка жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 душицы обыкновенной способствует накоплению антиоксидантов лишь в листьях образца **г-4** на 10-е сутки после обработки на 14,5% по сравнению с контролем.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Vokou D., Kokkini S., Bessiere J.M. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils // Biochemical Systematics and Ecology. 1993. Vol. 21. Issue 2. P. 287–295.
2. Adam K., Sviropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fructinosa* essential oils against human pathogenic fungi // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998. Vol. 46. Issue 5. P. 1739–1745.
3. Yoshino K., Higashi N., Koga K. Antioxidant and antiinflammatory activities of oregano extract // Journal of Health Science. 2006. Vol. 52. Issue 2. P. 169–173. <https://doi.org/10.1248/jhs.52.169>
4. Cosge B., Turker A., Ipek I., Gurbuz B. Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Letswaart, an endemic species to Turkey // Molecules. 2009. Vol. 14. Issue 5. P. 1702–1712. <https://doi.org/10.3390/molecules14051702>
5. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck C., Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review // Food and Chemical Toxicology. 2008. Vol. 46. Issue 2. P. 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
6. Habibi E., Shokrzadeh M., Chabra A., Naghshvar F., Keshavarz-Maleki R., Ahmadi A. Protective effects of *Origanum vulgare* ethanol extract against cyclophosphamide-induced liver toxicity in mice // Pharmaceutical Biology. 2015. Vol. 53. Issue 1. P. 10–15. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.908399>
7. Mohamed N.A., Nassier O.A. The antihyperglycaemic effect of the aqueous extract of *Origanum vulgare* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats // Jordan Journal of Biological Sciences. 2013. Vol. 6. Issue 1. P. 31–38.
8. Vujicic M., Nikolic I., Kontogianni V.G., Saksida T., Charisiadis P., Orescanin-Dusic Z., et al. Methanolic extract of *Origanum vulgare* ameliorates type 1 diabetes through antioxidant, anti-inflammatory and anti-

⁸ Шарова Е.И. Антиоксиданты растений: учеб. пособие. СПб.: Из-во С.-Петербургского ун-та, 2016. 140 с.

apoptotic activity // *British Journal of Nutrition*. 2015. Vol. 113. Issue 5. P. 770–782. <https://doi.org/10.1017/S0007114514004048>

9. Chuang L.-T., Tsai T.-H., Lien T.-J., Huang W.-C., Liu J.-J., Chang H., et al. Ethanolic extract of *Origanum vulgare* suppresses *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory responses in human monocyte and mouse ear edema models // *Molecules*. 2018. Vol. 23. Issue 8. P. 1987. <https://doi.org/10.3390/molecules23081987>

10. Ren H., Qin X., Huang B., Fernandez-Garcia V., Lv C. Responses of soil enzyme activities and plant growth in a eucalyptus seedling plantation amended with bacterial fertilizers // *Archives of Microbiology*. 2020. Vol. 202. Issue 6. P. 1381–1396. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01849-4>

11. Mushtaq T., Shah A.A., Akram W., Yasin N.A. Synergistic ameliorative effect of iron oxide nanoparticles and *Bacillus subtilis* S4 against arsenic toxicity in *Cucurbita moschata*: polyamines, antioxidants, and physiochemical studies // *International Journal of Phytoremediation*. 2020. Vol. 22. Issue 13. P. 1408–1419. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1781052>

12. Mahmood F., Shahid M., Hussain S., Haider M.Z., Shahzad T., Ahmed T., et al. *Bacillus firmus* strain FSS₂C ameliorated oxidative stress in wheat plants induced by azo dye (reactive black-5) // *3 Biotech*. 2020. Vol. 10. Issue 2. P. 40. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2031-y>

13. Khan M.A., Asaf S., Khan A.L., Jan R., Kang S.-M., Kim K.-M., et al. Extending thermotolerance to tomato seedlings by inoculation with SA1 isolate of *Bacillus cereus* and comparison with exogenous humic acid application // *PLoS ONE*. 2020. Vol. 15. Issue 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232228>

14. Yoo S.-J., Weon H.-Y., Song J., Sang M.K. Induced tolerance to salinity stress by halotolerant bacteria *Bacillus aryabhattai* H19-1 and *B. mesonae* H20-5 in tomato plants // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019. Vol. 29. Issue 7. P. 1124–1136. <https://doi.org/10.4014/jmb.1904.04026>

15. Saad M.M.G., Kandil M., Mohammed Y.M.M. Isolation and Identification of Plant Growth-Promoting Bacteria Highly Effective in Suppressing Root Rot in Fava Beans // *Current Microbiology*. 2020. Vol. 77. Issue 9. P. 2155–2165. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02015-1>

16. Shreya D., Jinal H.N., Kartik V.P., Amaresan N. Amelioration effect of chromium-tolerant bacteria on growth, physiological properties and chromium mobilization in chickpea (*Cicer arietinum*) under chromium stress // *Archives of Microbiology*. 2020. Vol. 202. Issue 4. P. 887–894. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01801-1>

17. Raddadi N., Cherif A., Ouzari H.I., Marzortti M., Brusetti L., Boudabous A., et al. *Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains // *Annals of Microbiology*. 2007. Vol. 57. Issue 4. P. 481–494. <https://doi.org/10.1007/bf03175344>

18. Makonde H.M., Lenga F.K., Masiga D., Mugo S., Boga H.I. Effects of *Bacillus thuringiensis* CRY1A(c) d-endotoxin on growth, nodulation and productivity of beans [*Phaseolus vulgaris* (L.) and siratro (*Macroptilium atropurpureum* DC.)] // *African Journal of Biotechnology*. 2010. Vol. 9. Issue 1. P. 017–024.

19. Azizoglu U. *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt // *Current Microbiology*. 2019. Vol. 76. Issue 11. P. 1379–1385. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01705-9>

20. Белоусова М.Е., Гришечкина С.Д., Ермолова В.П., Антоненко К.С., Марданов А.В., Ракитин А.Л. [и др.]. Секвенирование генома штамма *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 и изучение инсектицидной активности биологического препарата на его основе // *Сельскохозяйственная биология*. 2020. Т. 55. N 1. С. 87–96. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.1.87rus>

21. Bejaoui A., Chaabane H., Jemli M., Bouilila A., Boussaid M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at different phenological stages // *Journal of Medicinal Food*. 2013. Vol. 16. Issue 12. P. 1115–1120. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0079>

22. Rodriguez-Garcia I., Silva-Espinoza B.A., Ortega-Ramirez L.A., Leyva J.M., Siddiqui M.W., Cruz-Valenzuela M.R., et al. Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016. Vol. 56. Issue 10. P. 1717–1727. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.800832>

23. Putievsky E., Ravid U., Husain S.Z. Differences in the yield of plant material, essential oils and their main components during the life cycle of *Origanum vulgare* L. // *Proceedings of the International Symposium on Essential Oils “Essential oils and aromatic plants”* (1984, Noordwijkerhout, Netherlands). Noordwijkerhout, 1984. P. 185–189.

24. Храмов В.А., Агеева Е.М. Колориметрические методы определения содержания свободного пролина и аминокислот в покоящихся семенах пшеницы и их аналитическая активность // *Сельскохозяйственная биология*. 1986. N 10. С. 122–124.

25. Халафян А.А. Современные статистические методы медицинских исследований: монография. М.: Ленард, 2014. 320 с.

26. Taylor W., Camilleri E., Craft D.L., Korza G., Granados M.R., Peterson J., et al. DNA Damage Kills Bacterial Spores and Cells Exposed to 222-Nanometer UV Radiation // *Applied and Environmental Microbiology*. 2020. Vol. 86. Issue 8. P. e03039-19 (14 p.)

27. Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Zulfiqar F., Raza A., Mohsin S.M., Mahmud J.A., et al. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator // *Antioxidants*. 2020. Vol. 9. Issue 8. P. 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>

REFERENCES

1. Vokou D, Kokkini S, Bessiere JM. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1993;21(2):287–295.
2. Adam K, Sviropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fructinosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998;46(5):1739–1745.
3. Yoshino K, Higashi N, Koga K. Antioxidant and antiinflammatory activities of oregano extract. *Journal of Health Science*. 2006;52(2):169–173. <https://doi.org/10.1248/jhs.52.169>
4. Cosge B, Turker A, Ipek I, Gurbuz B. Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Letswaart, an endemic species to Turkey. *Molecules*. 2009;14(5):1702–1712. <https://doi.org/10.3390/molecules14051702>
5. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck C, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(2):446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
6. Habibi E, Shokrzadeh M, Chabra A, Naghshvar F, Keshavarz-Maleki R, Ahmadi A. Protective effects of *Origanum vulgare* ethanol extract against cyclophosphamide-induced liver toxicity in mice. *Pharmaceutical Biology*. 2015;53(1):10–15. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.908399>
7. Mohamed NA, Nassier OA. The antihyperglycaemic effect of the aqueous extract of *Origanum vulgare* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 2013;6(1):31–38.
8. Vujicic M, Nikolic I, Kontogianni VG, Saksida T, Charisiadis P, Orescanin-Dusic Z, et al. Methanolic extract of *Origanum vulgare* ameliorates type 1 diabetes through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activity. *British Journal of Nutrition*. 2015;113(5):770–782. <https://doi.org/10.1017/S0007114514004048>
9. Chuang L-T, Tsai T-H, Lien T-J, Huang W-C, Liu J-J, Chang H, et al. Ethanolic extract of *Origanum vulgare* suppresses *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory responses in human monocyte and mouse ear edema models. *Molecules*. 2018;23(8):1987. <https://doi.org/10.3390/molecules23081987>
10. Ren H, Qin X, Huang B, Fernandez-Garcia V, Lv C. Responses of soil enzyme activities and plant growth in a eucalyptus seedling plantation amended with bacterial fertilizers. *Archives of Microbiology*. 2020;202(6):1381–1396. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01849-4>
11. Mushtaq T, Shah AA, Akram W, Yasin NA. Synergistic ameliorative effect of iron oxide nanoparticles and *Bacillus subtilis* S4 against arsenic toxicity in *Cucurbita moschata*: polyamines, antioxidants, and physicochemical studies. *International Journal of Phytoremediation*. 2020;22(13):1408–1419. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1781052>
12. Mahmood F, Shahid M, Hussain S, Haider MZ, Shahzad T, Ahmed T, et al. *Bacillus firmus* strain FSS₂C ameliorated oxidative stress in wheat plants induced by azo dye (reactive black-5). *Bio-tech*. 2020;10(2):40. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2031-y>
13. Khan MA, Asaf S, Khan AL, Jan R, Kang S-M, Kim K-M, et al. Extending thermotolerance to tomato seedlings by inoculation with SA1 isolate of *Bacillus cereus* and comparison with exogenous humic acid application. *PLoS ONE*. 2020;15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232228>
14. Yoo S-J, Weon H-Y, Song J, Sang MK. Induced tolerance to salinity stress by halotolerant bacteria *Bacillus aryabhatai* H19-1 and *B. mesonae* H20-5 in tomato plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019;29(7):1124–1136. <https://doi.org/10.4014/jmb.1904.04026>
15. Saad MMG, Kandil M, Mohammed YMM. Isolation and Identification of Plant Growth-Promoting Bacteria Highly Effective in Suppressing Root Rot in Fava Beans. *Current Microbiology*. 2020;77(9):2155–2165. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02015-1>
16. Shreya D, Jinal HN, Kartik VP, Amaresan N. Amelioration effect of chromium-tolerant bacteria on growth, physiological properties and chromium mobilization in chickpea (*Cicer arietinum*) under chromium stress. *Archives of Microbiology*. 2020;202(4):887–894. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01801-1>
17. Raddadi N, Cherif A, Ouzari HI, Marzorati M, Brusetti L, Boudabous A, et al. *Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains. *Annals of Microbiology*. 2007;57(4):481–494. <https://doi.org/10.1007/bf03175344>
18. Makonde HM, Lenga FK, Masiga D, Mugo S, Boga HI. Effects of *Bacillus thuringiensis* CRY1A(c) d-endotoxin on growth, nodulation and productivity of beans [*Phaseolus vulgaris* (L.) and siratro (*Macroptilium atropurpureum* DC.)]. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(1):017–024.
19. Azizoglu U. *Bacillus thuringiensis* as a bio-fertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. *Current Microbiology*. 2019;76(11):1379–1385. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01705-9>
20. Belousova ME, Grishechkina SD, Ermolova VP, Antonets KS, Mardanov AV, Rakitin AL, et al. Whole genome sequencing of *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* 56 strain and the study of insect

ticidal activity of the biological preparation on its basis. *Sel'skokozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology*. 2020;55(1):87–96. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.1.87rus> (In Russian)

21. Bejaoui A, Chaabane H, Jemli M, Boulila A, Boussaid M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. glandulosum Desf. at different phenological stages. *Journal of Medicinal Food*. 2013;16(12):1115–1120. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0079>

22. Rodriguez-Garcia I, Silva-Espinoza BA, Ortega-Ramirez LA, Leyva JM, Siddiqui MW, Cruz-Valenzuela MR., et al. Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016;56(10):1717–1727. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.800832>

23. Putievsky E, Ravid U, Husain SZ. Differences in the yield of plant material, essential oils and their main components during the life cycle of *Origanum vulgare* L. In: *Essential oils and aromatic plants: Proceedings of the International Symposium*

on *Essential Oils*, 1984, Noordwijkerhout, Netherlands. Noordwijkerhout; 1984. p. 185–189.

24. Khramov VA, Ageeva EM. Colorimetric methods for determining the content of free proline and amino nitrogen in dormant wheat seeds and their analytical activity. *Sel'skokozyaistvennaya biologiya*. 1986;10:122–124. (In Russian)

25. Khalafyan AA. *Modern statistical methods in medical research*. Moscow: Lenard, 2014, 320 p. (In Russian)

26. Taylor W, Camilleri E, Craft DL, Korza G, Granados MR, Peterson J, et al. DNA Damage Kills Bacterial Spores and Cells Exposed to 222-Nanometer UV Radiation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020;86(8):e03039-19 (14 p.)

27. Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JA, et al. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*. 2020; 9(8):681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Крыжко Анастасия Владимировна,
к.с.-х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, протеомики и биоинформатики в сельском хозяйстве, Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, 295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150, Российская Федерация,
✉ e-mail: solanum@ukr.net

Буджурова Урьяне Меметовна.,
лаборант лаборатории молекулярной и клеточной биологии, Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, 295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150, Российская Федерация
e-mail: ubudzhurova@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Оба автора сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Статья поступила в редакцию 08.09.2020; одобрена после рецензирования 22.10.2020; принята к публикации 30.11.2020.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anastasiia V. Kryzhko,
Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Genetics, Proteomics and Bioinformatics in Agriculture Research Institute of Agriculture of Crimea, 150, Kievskaya St., Simferopol, 295453, Russian Federation,
✉ e-mail: solanum@ukr.net

Uryane M. Budzhurova,
Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Research Institute of Agriculture of Crimea, 150, Kievskaya St., Simferopol, 295453, Russian Federation,
e-mail: ubudzhurova@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

The article was submitted 08.09.2020; approved after reviewing 22.10.2020; accepted for publication 30.11.2020.

Оригинальная статья / Original article

УДК 581.1:661.163

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-657-665>



Особенности ростингибирующего эффекта фунгицида азоксистробина и его способность тормозить расход сахаров в проростках озимой пшеницы

© Е.В. Бережная*, А.В. Корсукова*, О.А. Федотова*, Н.В. Дорофеев*,
О.И. Грабельных***

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
г. Иркутск, Российская Федерация

**Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: Цель работы – оценить перспективы использования фунгицида азоксистробина, являющегося одним из представителей класса стробилуринов, для повышения устойчивости озимой пшеницы к низким температурам. Было изучено влияние азоксистробина на ростовые процессы, жизнеспособность клеток и содержание водорастворимых углеводов у озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Иркутская. Азоксистробин чаще, чем другие синтетические стробилурины, используется в составе многокомпонентных фунгицидных препаратов. Это фунгицид широкого спектра действия, вызывающий ингибирование комплекса III электрон-транспортной цепи митохондрий. Исследования проводились в лабораторных условиях на 3-суточных этиолированных проростках озимой пшеницы. Проростки выращивали в темноте при температуре +24 °С на растворе азоксистробина, растворенного в 0,36%-м водном растворе диметилсульфоксида; дистиллированной воде и 0,36%-м растворе диметилсульфоксида. Было оценено влияние ряда концентраций азоксистробина (2,5, 5, 10, 20 мкМ) на рост побегов и корней и жизнеспособность клеток побегов и корней проростков пшеницы. Азоксистробин оказывал концентрационно зависимое ростингибирующее действие на побеги и корни. Степень ингибирования варьировалась: для побегов – от 2,8% при концентрации 2,5 мкМ до 41,7% при концентрации 20 мкМ, для корней – от 34,6 до 63,1% при этих же концентрациях соответственно. Рост-ингибирующее действие не сопровождалось снижением жизнеспособности клеток побегов и корней, оценка которой проводилась с помощью прижизненного окрашивания флуоресцеин диацетатом. Также оценивали влияние азоксистробина в концентрации 10 мкМ на содержание сахаров в побегах проростков. При изученной концентрации азоксистробина содержание сахаров было выше на 3,6% по сравнению с проростками, выращенными на растворе диметилсульфоксида. Поскольку ингибирование роста и накопление сахаров являются важными факторами адаптации растений к низким температурам, представляются необходимыми дальнейшие исследования азоксистробина на физиолого-биохимические параметры растений, связанные с развитием низкотемпературной устойчивости.

Ключевые слова: фунгициды, стробилурины, азоксистробин, сахара, озимая пшеница, ингибирование роста, жизнеспособность

Благодарности: Работа выполнена с использованием коллекций ЦКП «Биоресурсный центр» и оборудования ЦКП «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Для цитирования: Бережная Е.В., Корсукова А.В., Федотова О.А., Дорофеев Н.В., Грабельных О.И. Особенности ростингибирующего эффекта фунгицида азоксистробина и его способность тормозить расход сахаров в проростках озимой пшеницы. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 4. С. 657–665. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-657-665>

Growth-inhibiting effect of azoxystrobin and its ability to inhibit sugar consumption in winter wheat sprouts and roots

Ekaterina V. Berezhnaya*, Anna V. Korsukova*, Olga A. Fedotova*,
Nikolay V. Dorofeev*, Olga I. Grabelnykh***

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS,
Irkutsk, Russian Federation

**Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: This study aimed to assess the prospects for the use of azoxystrobin, a fungicide of the strobilurin class, for increasing the resistance of winter wheat to low temperatures. The effect of azoxystrobin on growth processes, cell viability and the content of water-soluble carbohydrates in winter wheat (*Triticum aestivum* L.), the *Ikutskaya* variety, was studied. In comparison with other synthetic strobilurins, azoxystrobin is more frequently used in multicomponent fungicidal preparations. Azoxystrobin is a broad-spectrum fungicide that inhibits complex III of the mitochondrial electron transport chain. Experiments were carried out in laboratory conditions using 3-day-old etiolated winter wheat sprouts. The sprouts were grown in a dark place at a temperature of +24 °C on azoxystrobin solutions dissolved in a 0.36% aqueous solution of dimethyl sulfoxide, distilled water and a 0.36% dimethyl sulfoxide solution. The effect of various azoxystrobin concentrations (2.5, 5, 10 and 20 µM) on the growth of sprouts and roots was assessed, along with the viability of sprout and root cells. Azoxystrobin had a concentration-dependent growth-inhibiting effect on sprouts and roots. At concentrations of 2.5 µM and 20 µM, the inhibition degree for sprouts varied from 2.8% to 41.7%, respectively. For roots, these values comprised 34.6 and 63.1%, respectively. The growth-inhibiting effect was not accompanied by a decrease in the cell viability of sprouts and roots, which was assessed using *in vivo* staining with fluorescein diacetate (FDA). The effect of azoxystrobin at a concentration of 10 µM on the sugar content in germinated sprouts was also evaluated. At this concentration of azoxystrobin, the sugar content was higher by 3.6% in sprouts germinated on a dimethyl sulfoxide solution. Since growth inhibition and sugar accumulation are important factors in plant adaptation to low temperatures, further research into effects of azoxystrobin on the physiological and biochemical parameters of plants associated with the development of low-temperature resistance seems justified.

Keywords: fungicides, strobilurins, azoxystrobin, sugars, winter wheat, growth inhibition, viability

Acknowledgments: The work was carried out using the collections of the "Bioresource Centre" for collective use and the equipment of the "Bioanalytica" centre for collective use of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Irkutsk).

For citation: Berezhnaya EV, Korsukova AV, Fedotova OA, Dorofeev NV, Gabelnykh OI. Growth-inhibiting effect of azoxystrobin and its ability to inhibit sugar consumption in winter wheat sprouts and roots. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):657–665. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-657-665>

ВВЕДЕНИЕ

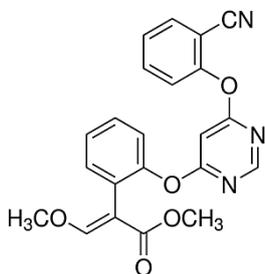
В современном сельском хозяйстве применяется множество химических препаратов для защиты растений от различных фитопатогенов. При этом известно, что действующие вещества этих препаратов влияют не только на патогенные организмы, но и на физиолого-биохимические процессы в растениях. Например, фунгициды китазин (класс фосфорорганических фунгицидов), карбендазим (производное бензамидазола) и гексаконазол (класс триазолов) оказывали различные эффекты на растения гороха, среди которых наблюдали уменьшение длины побегов и корней, снижение содержания фотосинтетических пигментов, а также азота и фосфора в корнях и побегах, увеличение содержания пролина и активности антиоксидантных ферментов [1]. Другое производное бензамидазола – беномил, на разные растения действовало неодинаково. Так, беномил снижал содержание фотосинтетических пигментов и фотосинтетическую активность у подсолнечника, но увеличивал эти показатели у хлопка [2]. Особо следует отметить исследования, выявившие способность фунгицида из группы триазолов (тебуконазола) повышать устойчивость злаков к низким температурам за счет его влияния на углеводный, белковый, жирнокислотный и дыхательный метаболизм и реализации ретардантного эффекта [3–5]. Фунгициды триазольной природы оказывают

на растения и другие физиологические эффекты [6].

Одними из широко используемых веществ в составе фунгицидных препаратов являются стробилурины – синтетические аналоги природных фунгицидов, продуцируемых *Strobilurus tenacellus*. Механизмом токсического действия стробилуринов является ингибирование электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий на уровне Q_{out} -сайта связывания убихинола в комплексе III [7]. Обработка растений фунгицидами этой группы повышает активность антиоксидантных ферментов, уменьшает степень перекисного окисления липидов, снижает содержание активных форм кислорода, способствует накоплению хлорофилла, ингибирует синтез этилена и увеличивает синтез абсцизовой кислоты (АБК) и индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) [8–12]. Накопление хлорофилла, ингибирование синтеза этилена и увеличение содержания ИУК под действием стробилуринов способствуют замедлению старения [10]. Предполагается участие стробилуринов в механизме развития устойчивости табака к негативному биотическому воздействию (вирусу табачной мозаики) [10]. При этом роль стробилуринов при действии абиотических стрессовых факторов остается невыясненной. Так, для разных стробилуринов отмечено как их положительное влияние (например, при действии таких факторов, как засуха и засоле-

ние) [13], так и возможная негативная роль, например, при водном дефиците [14].

Среди представителей стробилуринов наиболее широкое использование в составе фунгицидных препаратов получил азоксистробин¹:



Это фунгицид широкого спектра действия, ингибирующий прорастание спор грибов [15], обладает искореняющим, защитным, трансламинарным и системным действием². Применяется для различных культур (злаки, виноград, яблоня, банан, томаты и др.) в целях контроля таких заболеваний, как ржавчина, мучнистая роса, парша яблони, пирикулярриоз риса [15].

Цель данного исследования состояла в оценке перспектив использования азоксистробина как соединения, повышающего устойчивость озимой пшеницы к действию низких температур, что является актуальной проблемой, поскольку основной причиной гибели посевов является вымерзание [16]. Можно предположить, что как ингибитор митохондриального дыхания азоксистробин оказывает влияние не только на фитопатогенные грибы, но и на растения, что будет приводить к замедлению роста растений и накоплению водорастворимых углеводов. Замедление роста, как известно, является необходимым условием для прохождения растениями низкотемпературного закаливания, а водорастворимые углеводы играют роль криопротекторов при действии низких температур [17, 18]. Таким образом, в задачи настоящего исследования входило изучение влияния азоксистробина на ростовые процессы озимой пшеницы и содержание водорастворимых углеводов. Поскольку ингибирование роста может быть связано с угнетением жизнеспособности растительных клеток, также проводилась оценка фитотоксического действия азоксистробина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования использовали озимую пшеницу (*Triticum aestivum* L.) сорта Иркутская. Проростки выращивали в течение

3 суток при +24 °С в темноте в термостатируемой камере на растворах азоксистробина (Sigma Aldrich, Швейцария) концентрацией 2,5, 5, 10 и 20 мкМ. Азоксистробин растворяли в 0,36%-м водном растворе диметилсульфоксида (ДМСО). Далее этот состав среды выращивания обозначен как вариант «А3». Контролем являлись проростки, выращенные на дистиллированной воде (вариант «Дист. вода») и на 0,36%-м растворе ДМСО (вариант «ДМСО»). Проростки росли в кюветах на полипропиленовой сетке.

Для оценки влияния азоксистробина на рост проростков пшеницы измеряли длину побега и суммарную длину корней проростков. Степень ингибирования определяли как отношение разности длин побегов (суммарных длин корней) контрольных и обработанных растений к длине побега (суммарной длине корней) контрольных проростков.

Для оценки фитотоксического действия азоксистробина определяли жизнеспособность клеток интактных побегов и корней проростков с помощью метода прижизненного окрашивания флуоресцеин диацетатом (ФДА) [19]. Навеску растительной ткани (100 мг) инфильтровали и затем инкубировали в 2 мл буфера, содержащего 0,01 М Трис-НСl (рН = 7,4) и 5 мкМ ФДА (ФДА был растворен в ДМСО). После инкубации растительную ткань удаляли, а интенсивность флуоресценции раствора измеряли на спектрофлуориметре RF-5301 PC (Shimadzu, Япония) при длине волны возбуждения 494 нм и длине волны эмиссии 514 нм, размере входной и выходной щелей 3 мм. За показатель степени жизнеспособности принимали концентрацию флуоресцеина, которую определяли как отношение интенсивности флуоресценции на грамм сырого веса. Для контроля потери жизнеспособности измеряли интенсивность флуоресценции флуоресцеина для погибших после автоклавирования побегов и корней проростков.

Для определения содержания сахаров в побегах проростков использовали метод Диффе с антроновым реактивом³. Оптическую плотность окрашенного раствора определяли спектрофотометрически при длине волны 620 нм. Содержание углеводов определяли по калибровочной кривой, построенной по сахарозе, и выражали в процентах от суховоздушного веса растительной ткани.

Эксперименты проведены не менее чем в трех независимых повторах. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Одинаковые буквы на графиках указывают на отсутствие значимых отличий. Нормальность распределе-

¹Справочник пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории РФ за 2019 год. М.: ООО «Издательство Листерра», 2018. 864 с.

²Зинченко В.К. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность: учеб. пособие; 2-е изд., перераб. и доп. М.: КолосС, 2005. 232 с.

ния проверялась с помощью критерия Шапиро – Уилки. Данные по влиянию азоксистробина на рост побегов и корней и жизнеспособность клеток корней представлены как медиана с разбросом значений в виде интерквартильной широты (25%, 75%, процентыль), значимость отличий определяли по методу Данна (рост) и методу Тьюки (жизнеспособность корней). В остальных случаях результаты представлены как среднее арифметическое с разбросом значений в виде стандартного отклонения, значимость отличий определяли по методу Тьюки. Статистические расчеты осуществляли с помощью программного пакета SigmaPlot 12.5.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Следует отметить недостаточность литературных данных о влиянии представителей фунгицидов класса стробилуринов на ростовые процессы растений. В частности, имеются сведения о влиянии только двух соединений этого класса – азоксистробина и крезоксим-метила. Известно, что азоксистробин ингибирует рост числа клеток зеленой одноклеточной водоросли [20], а крезоксим-метил оказывает ингибирующий эффект на рост одноклеточной зеленой водоросли, ряски, суспензии клеток кукурузы и изолированных побегов горчицы и прорастание семян кресс-салата, степень которого различна в зависимости от исследуемого объекта [8]. Помимо ингибирующего эффекта для низких концентраций крезоксим-метила показана индукция морфогенеза и роста эксплантов стеблей табака, а также снижение ингибирующего эффекта, вызванного действием на побеги пшеницы синтетического аналога цитокинина [8].

Нами было исследовано действие азоксистробина в диапазоне концентраций 2,5–20 мкМ на рост побегов и корней этиолированных проростков озимой пшеницы (рис. 1). Выбор концентраций был обусловлен сведениями из литературы [20] и собственными предварительными опытами по влия-

нию азоксистробина на дыхание митохондрий побегов пшеницы *in vitro*. Авторы работы [20] наблюдали сходство в действии концентраций азоксистробина 2,5 и 1,25 мкМ на рост числа клеток зеленой одноклеточной водоросли и отсутствие физиологического эффекта меньших концентраций. Собственные опыты подтвердили сходный ингибирующий эффект этих концентраций при действии азоксистробина на скорость дыхания митохондрий пшеницы.

Азоксистробин вызывал ингибирование роста побегов и корней, при этом с увеличением концентрации его ингибирующий эффект усиливался. Для побегов степень ингибирования (в процентах от варианта «ДМСО») при действии азоксистробина в концентрации 20 мкМ составила 41,7%. При этом концентрация в 2,5 мкМ не оказала значимого влияния на длину побегов (степень ингибирования – 2,8%). Ингибирующий эффект действия азоксистробина на корни был более выраженным по сравнению с его действием на побеги. Степень ингибирования составила от 34,6% (для 2,5 мкМ) до 63,1% (для 20 мкМ).

Поскольку азоксистробин оказывал ингибирующее действие на рост этиолированных проростков пшеницы (побегов и корней), необходимо было выяснить, сопровождается ли это воздействие токсическим эффектом и снижением жизнеспособности клеток. Под фитотоксичностью понимается токсическое действие химических веществ на растения, которое зависит от ряда факторов (структура, промышленная форма, расход действующего вещества, биологические особенности растения, абиотические факторы) и имеет различные проявления: ожоги и хлороз листьев, снижение всхожести, ретардантные эффекты, потеря жизнеспособности пыльцы и др.² Для оценки жизнеспособности клеток использовали флуоресцентный зонд FDA, который проникает в живые клетки и под действием эндогенных эстераз превращается во флуоресцирующий флуоресцеин.

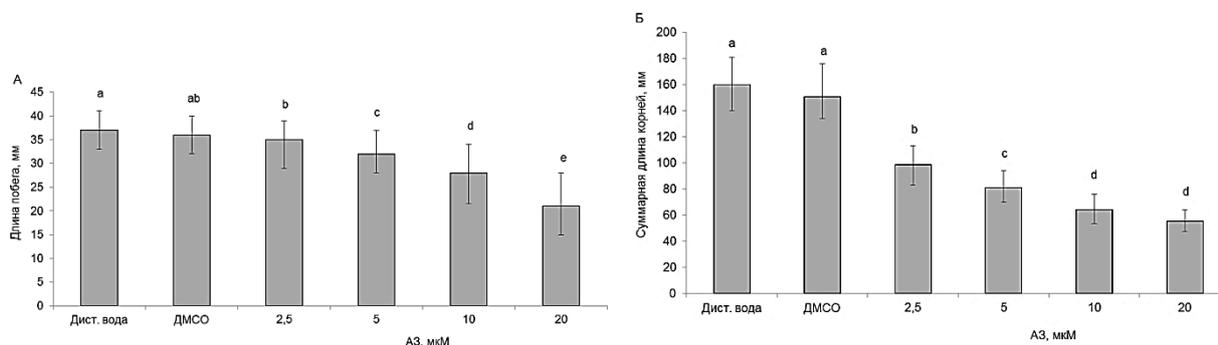


Рис. 1. Зависимость роста побегов (А) и корней (Б) озимой пшеницы от концентрации азоксистробина в среде выращивания. Дист. вода – дистиллированная вода, ДМСО – раствор ДМСО, АЗ – азоксистробин

Fig. 1. Dependence of the shoots (A) and roots (B) growth of winter wheat on azoxystrobin concentration in the growing medium. Дист. вода – distilled water, ДМСО – DMSO solution, АЗ – azoxystrobin

³Дише З. Общие цветные реакции. В кн.: Методы химии углеводов: пер. с англ.; под ред. Н.К. Кочеткова. М.: Мир, 1967. С. 21–24.

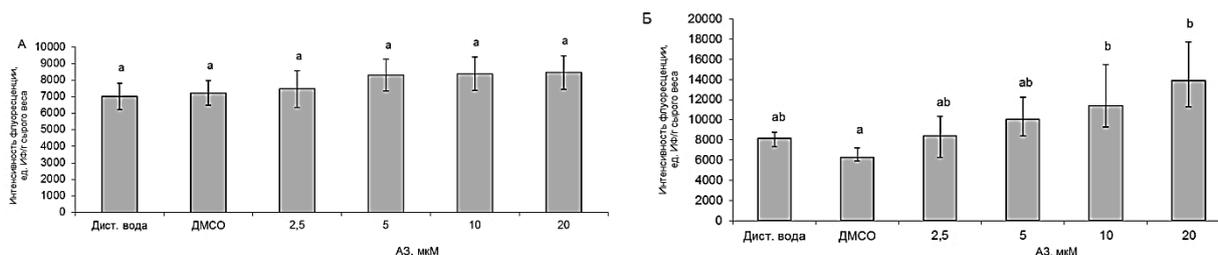


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина в побегах (А) и корнях (Б) от концентрации азоксистробина в среде выращивания. Обозначения те же, что и на рис. 1

Fig. 2. Dependence of the fluorescence intensity of fluorescein in shoots (A) and roots (B) on azoxystrobin concentration in the growing medium. The designations are the same as in Fig. 1

На рис. 2 представлена диаграмма интенсивности флуоресценции флуоресцеина (ИФ) в побегах и корнях проростков пшеницы в зависимости от состава среды выращивания (варианты «АЗ», «Дист. вода» и «ДМСО»).

Как видно из данных, представленных на рис. 2, азоксистробин не оказывает ингибирующего эффекта на активность эстераз и не снижает жизнеспособности клеток.

В ряде работ установлено токсическое действие стробилуринов на одноклеточные зеленые водоросли: ингибирование активности комплекса III ЭТЦ, снижение содержания транскриптов генов, кодирующих необходимые для фотосинтеза белки, снижение способности к фотосинтезу, нарушение клеточной структуры, разрушение ДНК, ингибирование роста [21–23]. В работе [14] показано, что два представителя класса стробилуринов (пираклостробин и пикоксистробин) снижают скорость устойчивой проводимости, скорость транспирации, скорость нетто-фотосинтеза, межклеточную концентрацию диоксида углерода, а также коэффициент F_v/F_m (квантовый выход фотосистемы II). Такие воздействия на фотосинтез могут негативно сказаться на накоплении биомассы растений и урожайности [24]. Установлено также повреждающее действие стробилуринов на клетки: выход электролитов из высечек листьев, обработанных стробилуринами и инкубированных на свету и в темноте, был больше, чем у высечек из необработанных листьев [10]. В нашей работе показано отсутствие фитотоксического эффекта азоксистробина в концентрациях 2,5–20 мкМ на клетки побегов и корней озимой пшеницы.

Поскольку азоксистробин ингибировал рост проростков озимой пшеницы и при этом не имел токсического эффекта, то предстояло выяснить, на какие физиологические параметры он влияет. Снижение ростовых процессов под действием азоксистробина может приводить к сокращению расхода сахаров, поэтому был проанализирован данный параметр. Действительно, было выявлено, что содержание сахаров в тканях побегов проростков пшеницы, выращенных на растворе азоксистробина с концентрацией 10 мкМ (при

которой рост побегов ингибируется на 22,2%), составляет 24,1% от сухого веса, что на 3,6% больше относительного содержания сахаров в проростках, выращенных на растворе ДМСО (рис. 3).

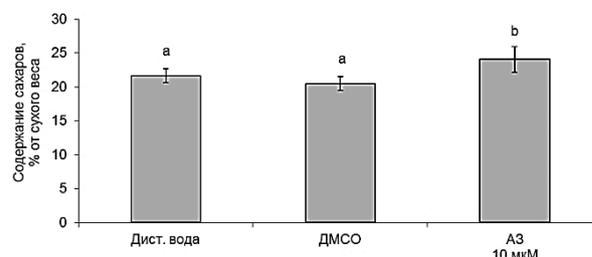


Рис. 3. Содержание сахаров в побегах проростков пшеницы, выращенных на растворе азоксистробина. Обозначения те же, что и на рис. 1

Fig. 3. Sugar content in shoots of wheat seedlings grown in azoxystrobin solution. The designations are the same as in Fig. 1

В некоторых работах также была отмечена способность стробилуринов влиять на содержание сахаров, которые, как известно, являются основными субстратами дыхания. Ингибирование ЭТЦ митохондрий при действии стробилуринов, возможно, будет способствовать более медленному расходованию сахаров. Помимо этого стробилурины повышают содержание АБК [8, 10], которая активирует экспрессию генов транспортеров сахаров и генов амилазы и тем самым способствует накоплению сахаров [25]. Так, пираклостробин увеличивал содержание сахаров в стеблях, листьях и плодах томата [26]. Крезоксим-метил увеличивал в листьях люцерны содержание рамнозы при нормальных условиях выращивания, но не оказывал влияния на ее содержание в условиях засухи [13]. И наоборот, данный препарат не оказывал влияния на содержание фруктозы и глюкозы при нормальных условиях, но увеличивал его при засухе так же, как и содержание мальтозы. Однако было отмечено, что при другом виде стресса – засолении, крезоксим-метил не влиял на содержание саха-

ров [13]. Можно предположить, что наблюдаемое нами более высокое содержание сахаров в побегах этиолированных проростков пшеницы, выращенных на растворе азоксистробина, наряду с его рост-ингибирующим действием будет оказывать благоприятное действие на формирование механизмов устойчивости к низкой температуре. Механизм снижения расхода сахаров или их накопления в растительных тканях под действием азоксистробина еще предстоит выяснить.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было определено влияние азоксистробина на рост побегов и корней, жизнеспособность клеток побегов и корней и относительное содержание сахаров в побегах этиолированных проростков озимой пшеницы. Фунгицид оказывал концентрационнозависимое ингибирующее действие на рост побегов и корней, которое не со-

проводилось снижением жизнеспособности клеток. При этом было установлено увеличение относительного содержания сахаров в тканях побегов при концентрации азоксистробина 10 мкМ. Замедление процессов роста и накопление водорастворимых углеводов в клетках являются важными факторами для формирования устойчивости растений к действию низких температур. Необходимы дальнейшие исследования по выявлению физиологических и биохимических эффектов действия азоксистробина и его роли в формировании холодо- и морозоустойчивости злаков. Знание об особенностях влияния стробилуринов на растения позволит использовать препараты на их основе не только как средства защиты от грибковых заболеваний, но и как вещества, оказывающие комплексное воздействие на рост и развитие растений, повышение их устойчивости.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Shahid M., Ahmed B., Zaidi A., Khan M.S. Toxicity of fungicides to *Pisum sativum*: a study of oxidative damage, growth suppression, cellular death and morpho-anatomical changes // RSC Advances. 2018. Vol. 8. P. 38483–38498. <https://doi.org/10.1039/c8ra03923b>
2. Ahmed A.M., Heikal M.D., Hindawy O.S. Side effects of benomyl (fungicide) treatments on sunflower, cotton and cowpea plants // Phytol. 1983. Vol. 23. Issue 2. P. 185–195.
3. Корсукова А.В., Боровик О.А., Грабельных О.И., Дорофеев Н.В., Побежимова Т.П., Войников В.К. Повышение холодостойкости проростков яровой пшеницы при обработке семян тебуконазолом // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2015. N 4. С. 30–36.
4. Korsukova A.V., Borovik O.A., Grabelnych O.I., Voinikov V.K. The tebuconazole-based protectant of seeds “Bunker” induces the synthesis of dehydrins during cold hardening and increases the frost resistance of wheat seedlings // Journal Stress Physiology & Biochemistry. 2015. Vol. 11. Issue 4. P. 118–127.
5. Korsukova A.V., Gornostai T.G., Grabelnych O.I., Dorofeev N.V., Pobezhimova T.P., Sokolova N.A., et al. Tebuconazole regulates fatty acid composition of etiolated winter wheat seedlings // Journal Stress Physiology & Biochemistry. 2016. Vol. 12. Issue 2. P. 72–79.
6. Побежимова Т.П., Корсукова А.В., Дорофеев Н.В., Грабельных О.И. Физиологические эффекты действия на растения фунгицидов триазольной природы // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N 3. С. 461–476. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-461-476>
7. Bartlett D.W., Clough J.M., Godwin J.R., Hall A.A., Hamer M., Parr-Dobrzanski B. The strobilurin fungicides // Pest Management Science. 2002. Vol. 58. Issue 7. P. 649–662. <https://doi.org/10.1002/ps.520>
8. Grossmann K., Retzlaff G. Bioregulatory effects of the fungicidal strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*) // Pest Management Science. 1997. Vol. 50. Issue 1. P. 11–20. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199705\)50:1%3C11::AID-PS556%3E3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199705)50:1%3C11::AID-PS556%3E3.0.CO;2-8)
9. Glaab J., Kaiser W.M. Increased nitrate reductase activity in leaf tissue after application of the fungicide kresoxim-methyl // Planta. 1999. Vol. 207. Issue 3. P. 442–448. <https://doi.org/10.1007/s004250050503>
10. Köhle H., Grossmann K., Jabs T., Gerhard M., Kaiser W., Glaab J., et al. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants // Modern fungicides and antifungal compounds III: 13th International Reinhardtsbrunn Symposium (Friedrichroda, May 14th–18th 2001). Bonn: Agroconcept, 2002. P. 61–74.
11. Zhang Y.-J., Zhang X., Chen C.-J., Zhou M.-G., Wang H.-C. Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazole and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield of winter wheat // Pesticide Biochemistry and Physiology. 2010. Vol. 98. Issue 2. P. 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.04.007>
12. Liang S., Xu X., Lu Z. Effect of azoxystrobin fungicide on the physiological and biochemical indices and ginsenoside contents of ginseng leaves // Journal of Ginseng Research. 2018. Vol. 42. Issue 2. P. 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2017.02.004>
13. Filippou P., Antoniou C., Obata T., Van Der Kelen K., Harokopos V., Kanetis L., et al. Kresoxim-methyl primes *Medicago truncatula* plants against abiotic stress factors via altered reactive oxygen and nitrogen species signalling leading to downstream transcriptional and metabolic readjustment // Journal of Experimental Botany. 2016. Vol. 67. Issue 5. P. 1259–1274. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv516>

14. Nason M.A., Farrar J., Bartlett D. Strobilurin fungicides induce changes in photosynthetic gas exchange that do not improve water use efficiency of plants grown under conditions of water stress // *Pest Management Science*. 2007. Vol. 63. Issue 12. P. 1191–1200. <https://doi.org/10.1002/ps.1443>
15. Pohanish R.P. *Sittig's handbook of pesticides and agricultural chemicals*. 2 ed. Norwich: William Andrew Publishing, Elsevier, 2015. 1006 p.
16. Куперман Ф.М., Моисейчик В.А. Выпревание озимых культур. Л.: Гидрометеоиздат, 1977. 168 с.
17. Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. М.: Наука, 1979. 352 с.
18. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. Тимирязевские чтения. Сер. 64. М.: Наука, 2003. 54 с.
19. Yamori W., Kogami H., Masuzawa T. Freezing tolerance in alpine plants as assessed by the FDA-staining method // *Polar Bioscience*. 2005. Vol. 18. P. 73–81.
20. Lu T., Zhu Y., Xu J., Ke M., Zhang M., Tan C., et al. Evaluation of the toxic response induced by azoxystrobin in the non-target green alga *Chlorella pyrenoidosa* // *Environmental Pollution*. 2018. Vol. 234. P. 379–388. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.081>
21. Shen Y.-F., Liu L., Gong Y.-X., Zhu B., Liu G.-L., Wang G.-X. Potential toxic effect of trifloxystrobin on cellular microstructure, mRNA expression and antioxidant enzymes in *Chlorella vulgaris* // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014. Vol. 37. Issue 3. P. 1040–1047. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.04.006>
22. Liu X., Wang Y., Chen H., Zhang J., Wang C., Li X., et al. Acute toxicity and associated mechanisms of four strobilurins in algae // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018. Vol. 60. P. 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.021>
23. Du B., Zhang Z., Liu W., Ye Y., Lu T., Zhou Z., et al. Acute toxicity of the fungicide azoxystrobin on the diatom *Phaeodactylum tricoratum* // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019. Vol. 168. P. 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.074>
24. Dias M.C. Phytotoxicity: an overview of the physiological responses of plants exposed to fungicides // *Journal of Botany*. 2012. Vol. 2012. Article ID 135479, 4 p. <https://doi.org/10.1155/2012/135479>
25. Ma Q.-J., Sun M.-H., Lu J., Liu Y.-J., Hu D.-G., Hao Y.-J. Transcription factor AREB₂ is involved in soluble sugar accumulation by activating sugar transporter and amylase genes // *Plant Physiology*. 2017. Vol. 174. Issue 4. P. 2348–2362. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00502>
26. Marek J., de Azevedo D., Ono E.O., Rodrigues J.D., Faria C.M.D.R. Photosynthetic and productive increase in tomato plants treated with strobilurins and carboxamides for the control of *Alternaria solani* // *Scientia Horticulturae*. 2018. Vol. 242. Issue 12. P. 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.07.028>

REFERENCES

1. Shahid M, Ahmed B, Zaidi A, Khan MS. Toxicity of fungicides to *Pisum sativum*: a study of oxidative damage, growth suppression, cellular death and morpho-anatomical changes. *RSC Advances*. 2018;8:38483–38498. <https://doi.org/10.1039/c8ra03923b>
2. Ahmed AM, Heikal MD, Hindawy OS. Side effects of benomyl (fungicide) treatments on sunflower, cotton and cowpea plants. *Phyton*. 1983;23(2):185–195.
3. Korsukova AV, Borovik OA, Grabelnych OI, Dorofeev NV. Increase of cold resistance of spring wheat seedlings by the tebuconazole treatment of the seeds. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2015;4:30–36. (In Russian)
4. Korsukova AV, Borovik OA, Grabelnych OI, Voinikov VK. The tebuconazole-based protectant of seeds “Bunker” induces the synthesis of dehydrins during cold hardening and increases the frost resistance of wheat seedlings. *Journal Stress Physiology & Biochemistry*. 2015;11(4):118–127.
5. Korsukova AV, Gornostai TG, Grabelnych OI, Dorofeev NV, Pobezhimova TP, Sokolova NA, et al. Tebuconazole regulates fatty acid composition of etiolated winter wheat seedlings. *Journal Stress Physiology & Biochemistry*. 2016;12(2):72–79.
6. Pobezhimova TP, Korsukova AV, Dorofeev NV, Grabelnych OI. Physiological effects of triazole fungicides in plants. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019; 9(3):461–476. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-461-476>
7. Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M, Parr-Dobrzanski B. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*. 2002;58(7):649–662. <https://doi.org/10.1002/ps.520>
8. Grossmann K, Retzlaff G. Bioregulatory effects of the fungicidal strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). *Pest Management Science*. 1997;50(1):11–20. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199705\)50:1%3C11::AID-PS556%3E3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199705)50:1%3C11::AID-PS556%3E3.0.CO;2-8)
9. Glaab J, Kaiser WM. Increased nitrate reductase activity in leaf tissue after application of the fungicide kresoxim-methyl. *Planta*. 1999;207(3):442–448. <https://doi.org/10.1007/s004250050503>
10. Köhle H, Grossmann K, Jabs T, Gerhard M, Kaiser W, Glaab J, et al. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. In: *Modern fungicides and antifungal compounds III: 13th International Reinhardtsbrunn Symposium*, Friedrichroda, May

14–18 2001, Bonn: Agroconcept; 2002. p. 61–74.

11. Znanj Y-J, Zhang X, Chen C-J, Zhou M-G, Wang H-C. Effects of fungicides JS399-19, azoxystrobin, tebuconazole and carbendazim on the physiological and biochemical indices and grain yield of winter wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2010;98(2):151–157. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.04.007>

12. Liang S, Xu X, Lu Z. Effect of azoxystrobin fungicide on the physiological and biochemical indices and ginsenoside contents of ginseng leaves. *Journal of Ginseng Research*. 2018;42(2):175–182. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2017.02.004>

13. Filippou P, Antoniou C, Obata T, Van Der Kelen K, Harokopos V, Kanetis L, et al. Kresoxim-methyl primes *Medicago truncatula* plants against abiotic stress factors via altered reactive oxygen and nitrogen species signalling leading to downstream transcriptional and metabolic readjustment. *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(5):1259–1274. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv516>

14. Nason MA, Farrar J, Bartlett D. Strobilurin fungicides induce changes in photosynthetic gas exchange that do not improve water use efficiency of plants grown under conditions of water stress. *Pest Management Science*. 2007;63(12):1191–1200. <https://doi.org/10.1002/ps.1443>

15. Pohanish RP. *Sittig's handbook of pesticides and agricultural chemicals*. 2nd ed. Norwich: William Andrew Publishing, Elsevier; 2015. 1006 p.

16. Kuperman FM, Moiseichik VA. *Damping out of winter crops*. Leningrad. Gidrometeoizdat; 1977. 168 p. (In Russian)

17. Tumanov II. *Plant physiology of hardening and frost resistance*. Moscow. Nauka; 1979. 352 p. (In Russian)

18. Trunova TI. The plant and low temperature stress. In: *Timiryazevskie chteniya. Ser. 64*. Moscow: Nauka; 2003. 54 p. (In Russian)

19. Yamori W, Kogami H, Masuzawa T. Fre-

ezing tolerance in alpine plants as assessed by the FDA-staining method. *Polar Bioscience*. 2005;18:73–81.

20. Lu T, Zhu Y, Xu J, Ke M, Zhang M, Tan C, et al. Evaluation of the toxic response induced by azoxystrobin in the non-target green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Pollution*. 2018;234:379–388. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.081>

21. Shen Y-F, Liu L, Gong Y-X, Zhu B, Liu G-L, Wang G-X. Potential toxic effect of trifloxystrobin on cellular microstructure, mRNA expression and antioxidant enzymes in *Chlorella vulgaris*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014;37(3):1040–1047. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.04.006>

22. Liu X, Wang Y, Chen H, Zhang J, Wang C, Li X, et al. Acute toxicity and associated mechanisms of four strobilurins in algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018;60:12–16. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.021>

23. Du B, Zhang Z, Liu W, Ye Y, Lu T, Zhou Z, et al. Acute toxicity of the fungicide azoxystrobin on the diatom *Phaeodactylum tricoratum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019;168:72–79. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.074>

24. Dias MC. Phytotoxicity: an overview of the physiological responses of plants exposed to fungicides. *Journal of Botany*. 2012;2012. Article ID 135479, 4 p. <https://doi.org/10.1155/2012/135479>

25. Ma Q-J, Sun M-H, Lu J, Liu Y-J, Hu D-G, Hao Y-J. Transcription factor AREB₂ is involved in soluble sugar accumulation by activating sugar transporter and amylase genes. *Plant Physiology*. 2017;174(4):2348–2362. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00502>

26. Marek J, de Azevedo D, Ono EO, Rodrigues JD, Faria CMDR. Photosynthetic and productive increase in tomato plants treated with strobilurins and carboxamides for the control of *Alternaria solani*. *Scientia Horticulturae*. 2018;242(12):76–89. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.07.028>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бережная Екатерина Владиславовна, аспирант, Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН; 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Российская Федерация, ✉ e-mail: ekaterina809@mail.ru

Корсукова Анна Викторовна, к.б.н., младший научный сотрудник Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН; 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Российская Федерация, e-mail: avkorsukova@gmail.com

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ekaterina V. Berezhnaya, Postgraduate Student, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, 132, Lermontov St., Irkutsk, 664033, Russian Federation, ✉ e-mail: ekaterina809@mail.ru

Anna V. Korsukova, Cand. Sci. (Biology), Junior Researcher, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS; 132, Lermontov St., Irkutsk, 664033, Russian Federation, e-mail: avkorsukova@gmail.com

Федотова Ольга Андреевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН;
664033, и. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: ol.borovik@mail.ru

Дорофеев Николай Владимирович,
к.б.н., заместитель директора по прикладной
и инновационной работе,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН;
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Рос-
сийская Федерация,
e-mail: nikolay.v.dorofeev@gmail.com

Грабельных Ольга Ивановна,
д.б.н., доцент, главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация;
профессор,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: grolga@sifibr.irk.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Статья поступила в редакцию 19.05.2020;
одобрена после рецензирования 02.10.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

Olga A. Fedotova,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS;
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: ol.borovik@mail.ru

Nikolay V. Dorofeev,
Cand. Sci. (Biology), Deputy Director
for Applied and Innovative Work,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS;
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: nikolay.v.dorofeev@gmail.com

Olga I. Grabelnych,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor,
Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation;
Professor, Irkutsk State University,
1, K. Marks St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: grolga@sifibr.irk.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 19.05.2020;
approved after reviewing 02.10.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 623.039.8, 664.8.039

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-666-677>



Изучение изменений физико-химических и микробиологических показателей полуфабриката из картофеля после электронной стерилизации

© А.А. Дриль, А.Н. Сапожников

Новосибирский государственный технический университет,
г. Новосибирск, Российская Федерация

Резюме: Одним из методов электронной стерилизации плодоовощных культур и сельскохозяйственной продукции является ионизирующее излучение, которое также называется бета-излучение. Оно способствует сохранению качества и безопасности многих видов сельскохозяйственных культур после их уборки и может быть использовано для обработки производимых из него полуфабрикатов. Целью работы явилось исследование влияния различных доз ионизирующего излучения (1, 3, 6 и 9 кГр) на вакуумированный очищенный и нарезанный картофель сорта Беллароза, обработанный аскорбиновой кислотой в концентрации 3, 6 и 9% с целью сохранения в нем после обработки нативного содержания витамина С и исходных структурно-механических свойств. Используемые для вакуумирования ПЭТ-пакеты не выделяют опасных и вредных примесей в агрессивной среде (9%-ом растворе аскорбиновой кислоты) и дозе облучения 9 кГр. Исследования органолептических, физико-химических и микробиологических показателей образцов полуфабриката из картофеля осуществлялось по стандартным методикам. Результаты исследований показали, что доза облучения 1 кГр не оказывает значительного влияния на показатели полуфабриката, но при этом и не способствует снижению числа микроорганизмов в нем. Доза 3 кГр также не оказывает значительного влияния на показатели полуфабриката, однако, снижение количества микроорганизмов уже более значительно. Доза облучения 6 кГр оказывает значительное воздействие на микробиологические показатели полуфабриката, в то же время при малых концентрациях аскорбиновой кислоты (3 и 6%) начинают ухудшаться органолептические показатели полуфабриката. При дозе облучения 9 кГр погибают практически все микроорганизмы и ухудшаются показатели полуфабриката вне зависимости от концентрации аскорбиновой кислоты. На основании проведенных исследований определены оптимальные дозы облучения полуфабриката из картофеля – 3 и 6 кГр, и оптимальная концентрация аскорбиновой кислоты – 9%, при которых показатели качества и безопасности полуфабриката сохраняются на протяжении 7 суток хранения.

Ключевые слова: картофель, овощной полуфабрикат, электронная стерилизация, ионизирующее излучение, сроки хранения, показатели качества

Для цитирования: Дриль А.А., Сапожников А.Н. Изучение изменений физико-химических и микробиологических показателей полуфабриката из картофеля после электронной стерилизации. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 4. С. 666–677. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-666-677>

Study of physicochemical changes and microbiological parameters of semi-finished potato products after electron-beam sterilization

Anastasiia A. Dril, Aleksandr N. Sapozhnikov

Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract: A popular method for electron-beam sterilization of agricultural products consists in their exposure to ionizing radiation, also called beta-radiation. Beta-radiation contributes to the preservation of the quality and safety of freshly harvested crops and can be used to disinfect semi-finished products. In this work, we aimed to study the effect of various doses of ionizing radiation (1, 3, 6 and 9 kGy) on vacuumized peeled and cut potatoes of the Bellarosa variety. Potato samples were treated with ascorbic acid at concentrations of 3, 6 and 9% in order to preserve the native content of vitamin C and the initial structural and mechanical prop-

erties. PET packages were used for evacuation, since this material emits no hazardous or harmful impurities in such aggressive environments as 9% ascorbic acid solution and 9 kGy radiation. Studies of organoleptic, physicochemical and microbiological parameters of semi-finished potato products were carried out using conventional methods. According to the obtained results, an irradiation dose of 1 kGy neither affects significantly the quality of a semi-finished potato product, nor contributes to a decrease in the number of pathogens. An irradiation dose of 3 kGy has no significant effect on the controlled parameters, although a decrease in the number of pathogens is observed. An irradiation dose of 6 kGy has a significant effect on the microbiological indicators; however, at low concentrations of ascorbic acid (3 and 6%), the organoleptic indicators of the studied semi-finished products begin to deteriorate. At a dose of 9 kGy, almost all microorganisms die, and the controlled parameters deteriorate regardless of the ascorbic acid concentration. It is concluded that the optimal irradiation doses for semi-finished potato products comprise 3 and 6 kGy. The optimal concentration of ascorbic acid was found to be 9%, at which the quality and safety indicators of semi-finished potato products are preserved for 7 days of storage.

Keywords: potato, semi-finished vegetable product, electron-beam sterilization, ionizing radiation, shelf life, quality indicators

For citation: Dril AA, Sapozhnikov AN. Study of physicochemical changes and microbiological parameters of semi-finished potato products after electron-beam sterilization. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):666–677. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-666-677>

ВВЕДЕНИЕ

Картофель является важной сельскохозяйственной культурой, возделываемой в целях получения подземных клубней, которые служат пищевым и кормовым продуктом и промышленным сырьем. В России и других странах мира его производство осуществляется в достаточно больших объемах, в связи с чем возникает проблема сохранения его качества и безопасности при хранении. Стоит отметить, что данной проблеме уделяется недостаточно внимания. Так, если при выращивании картофеля решаются задачи, направленные на повышение его урожайности, то при хранении – прежде всего на его защиту от фитопатогенов и в меньшей степени – на сохранение качества и потребительских свойств [1].

Перспективным методом сохранения качества картофеля и производимых из него полуфабрикатов является применение ионизирующего излучения в виде электронного или фотонного излучений, также соответственно называемых «бета-излучение» и «гамма-излучение». Известны способы применения ионизирующего излучения в диапазоне от 0,15 до 1 кГр для ингибирования прорастания картофеля во время его хранения при различных режимах [2–11] или в дозе от 1 кГр и выше – для стерилизации с целью снижения содержания в нем патогенных микроорганизмов [5, 12] и насекомых-вредителей [13]. При электронной стерилизации, применяемой для обработки сушеного картофеля, было отмечено, что доза 6 кГр снижает микробиологическую обсемененность продукции, не оказывая при этом отрицательного влияния на его органолептические показатели [14].

Эффект стерилизации наступает за счет ионизации и возбуждения атомов веществ, входящих в состав микроорганизмов, при поглоще-

нии ими энергии ионизирующих излучений, вследствие чего у микроорганизмов снижаются их рост и размножение [15].

Вместе с тем стерилизация сельскохозяйственных культур и сельскохозяйственной продукции ионизирующим излучением не оказывает значительного воздействия на количественное содержание витаминов в них. В свою очередь радиостойкость разных витаминов различается и зависит от химического состава растительного сырья, в котором они содержатся [16–18]. Известно, что из химически чистых водорастворимых витаминов наименьшей стойкостью отличается аскорбиновая кислота (витамин С), в то время как, находясь в биологических объектах в связанном состоянии, витамин С более стоек к различным видам внешних воздействий. Кроме того, отмечены различия во влиянии облучения на сохраняемость витаминов в сельскохозяйственной продукции по сравнению с другими методами тепловой стерилизации, консервации и пастеризации [19]. В качестве примера можно привести данные исследований, которые показали, что при радиационной стерилизации картофеля, хранившегося в течение 5 месяцев, сохранность витамина С была на том же уровне, что и у необработанного картофеля [20].

При обработке ионизирующим излучением с целью предотвращения действия патогенных грибов и микроорганизмов у сельскохозяйственной продукции с высоким содержанием воды (мясо, плоды и овощи) обработка ионизирующим излучением воздействует лишь на их поверхность, тогда как в продукции с низким содержанием влаги (пряности, чай и др.) ионизирующее излучение проникает через насыпной слой продукта примерно на 15–20 см, т.е. полностью пронизывает упаковку, либо обработка уже упакованного продукта производится с двух сторон [1].

В большинстве случаев исследованы возможности использования ионизирующих излучений для ингибирования патогенных микроорганизмов, сельскохозяйственных вредителей и контроля прорастания. Некоторые исследования проводились в отношении радиочувствительных инфекционных возбудителей. При этом изучался характер изменений в обрабатываемых ионизирующим излучением продуктах и различных веществах. В данном направлении шли широко-масштабные исследования в США, и аналогичные – в странах Западной Европы и ряде стран бывшего СССР [20–22].

Таким образом, подбор оптимальных параметров процесса обработки ионизирующим излучением сельскохозяйственных культур и сельскохозяйственной продукции (на примере картофеля и полуфабрикатов из него) является актуальным. Подобные исследования важны для выяснения влияния облучения на сохранность биологически активных веществ и жизнедеятельность микроорганизмов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Основной задачей экспериментальных исследований являлось исследование влияния ионизирующего излучения на полуфабрикаты из картофеля сорта Беллароза. Основные исследования проводились на кафедре технологии и организации пищевых производств Новосибирского государственного технического университета (НГТУ) и Биотехнопарке «Кольцово» и включали предварительный и основной этапы.

Известно, что непосредственное воздействие ионизирующего излучения приводит к измене-

нию структуры клеток растительного сырья, поэтому на предварительном этапе исследовалось влияние дозы ионизирующего излучения на структуру картофеля. Для этого картофель подвергли механической очистке. Затем очищенный, промытый и дочищенный картофель нарезался кубиком, упаковывался в ПЭТ-пакеты, вакуумировался на аппарате JEJU JDZ-260/PD и обрабатывался ионизирующим излучением в дозах 1, 3, 6 и 9 кГр на радиационной установке конвейерного типа ИЛУ-14 на основе линейного ускорителя электронов с энергией 10 МэВ в Биотехнопарке «Кольцово», после чего исследовались структурно-механические свойства образцов.

Ранее в лабораториях кафедры химии и химической технологии НГТУ было проведено исследование совместного воздействия ионизирующего излучения и аскорбиновой кислоты на ПЭТ-упаковку на приборе синхронного термического анализа NETZSH Jupiter STA 449 C в сопряжении с масс-спектрометром Aeolos II. Данная измерительная система позволяет синхронно проводить исследования термогравиметрическим методом (ТГ) и методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

На рис. 1 представлены кривые ТГ и ионных токов выделяющихся газов при нагреве исследуемого образца ПЭТ-пленки, подверженной воздействию ионизирующего излучения при дозе 9 кГр с последующим погружением в раствор аскорбиновой кислоты (это является максимальными показателями для проведения дальнейших опытов).

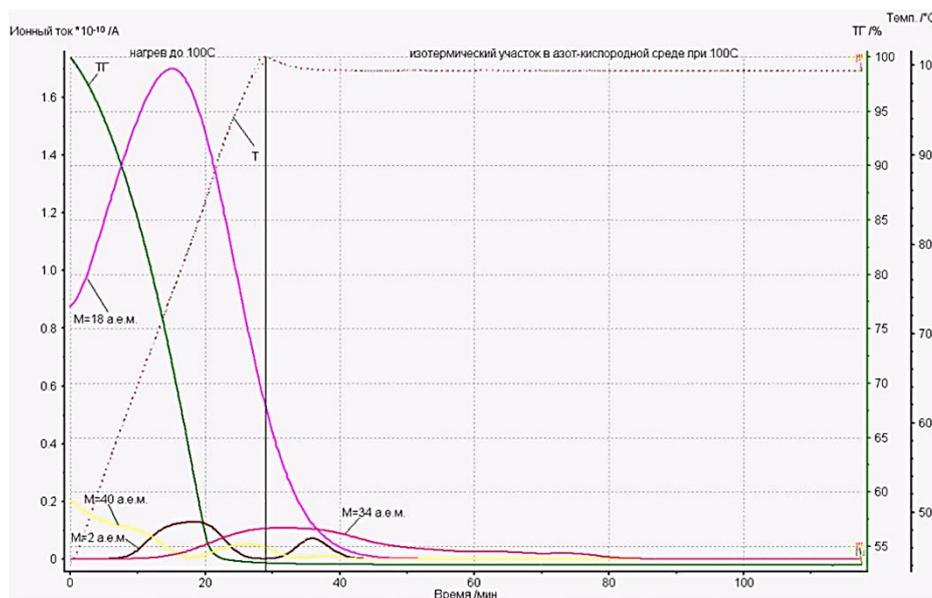


Рис. 1. Термогравиметрические кривые и кривые ионного тока выделяющихся газов при анализе образцов ПЭТ-пленки, обработанных 9%-м раствором аскорбиновой кислоты (с массой 18 а.е.м.)

Fig. 1. Curves of thermogravimetric analysis and ion current of evolved gases in the analysis of PET film samples treated with 9% acetic acid solution (with a mass of 18 atomic mass units)

Выявлено, что летучие вещества выделяются в количестве, соответствующем величине атомных единиц массы. Следует отметить, что в период разогрева образца до требуемой температуры происходит испарение раствора аскорбиновой кислоты, о чем можно судить по кривой ТГ (кривая изменения массы образца от времени/температуры). На протяжении изотермического участка происходит выделение газообразных веществ вплоть до 85-й минуты. Следовательно, общая масса выделившихся летучих веществ, образующихся при воздействии агрессивной среды (аскорбиновой кислоты) и ионизирующего излучения, не превышает допустимых значений [23].

На рис. 2 представлены характерные структурные изменения образцов картофеля при различных дозах облучения. Структурно-механические свойства образцов рассмотрены путем микроскопирования на лабораторном микроскопе Микмед-5 при увеличении в 10^3 крат. При увеличении дозы облучения от образца **b** до образца **e** прослеживается изменение структуры межклеточного пространства (примеры областей разрушений выделены красным контуром).

В контрольном (не облученном) образце картофеля (образец **a**) нарушений структуры не наблюдалось, межклеточные стенки не повреждены. При воздействии дозы 1 кГр (образец **b**) наблюдалось уменьшение толщины клеточных стенок. При воздействии дозы 3 кГр (образец **c**) часть стенок разрушилась. В образце **d**, обработанном при 6 кГр, стенки подверглись большому разрушению по сравнению с образцом **c**. При воздействии дозы 9 кГр (образец **e**) характерно выражены области полного разрушения межклеточных стенок. В то же время при органолептической оценке у образцов **c** и **d** наблюдалось выделение влаги, а у образца **e** – размягченная консистенция, чего не было у остальных образцов. Таким образом, обработка картофеля ионизирующим излучением при увеличении дозы вызывает его органолептические и структурные изменения, отрицательным образом влияющие на его качество.

Предварительный этап включал проведение исследований по воздействию обработки поверхности картофеля различными пищевыми органическими кислотами (уксусная, лимонная, аскорбиновая) в концентрации от 1 до 9% при дозах излучения от 1 до 9 кГр на органолептические и структурные свойства картофеля. Общеизвестно, что органические кислоты предотвращают размягчение картофеля под воздействием ряда факторов вследствие разрушения связей между клеточными стенками в нем за счет деструкции протопектина, гемицеллюлоз и структурного белка экстенсина [24]. Кроме того, органические кислоты предотвращают потемнение картофеля и снижение в нем количественного содержания витамина С [25]. Постановка эксперимента осуществлялась аналогично вышеуказанной методике, при этом после механической очистки поверхность картофеля обрабатывалась (промывалась) растворами вышеуказанных органических кислот концентрацией 3, 6 и 9%. Расход растворов кислот различной концентрации составлял 3 л на 1 кг картофеля.

Результаты исследований показали, что наиболее эффективным является использование аскорбиновой кислоты (витамина С). Это подтвердилось тем, что в образцах до и после облучения значительного уменьшения концентрации аскорбиновой кислоты не наблюдалось и по органолептическим исследованиям образцы картофеля не изменили своего цвета и нативных структурно-механических свойств.

Основной этап исследований осуществлялся в соответствии с вышеуказанными методиками с использованием аскорбиновой кислоты.

На всех этапах исследования оборудование, инвентарь и спецодежда, используемые для механической обработки и упаковки картофеля, были обработаны дезинфицирующим раствором. Все эксперименты проводились не менее чем в трех повторностях.

Перечень исследуемых образцов картофеля представлен в табл. 1.

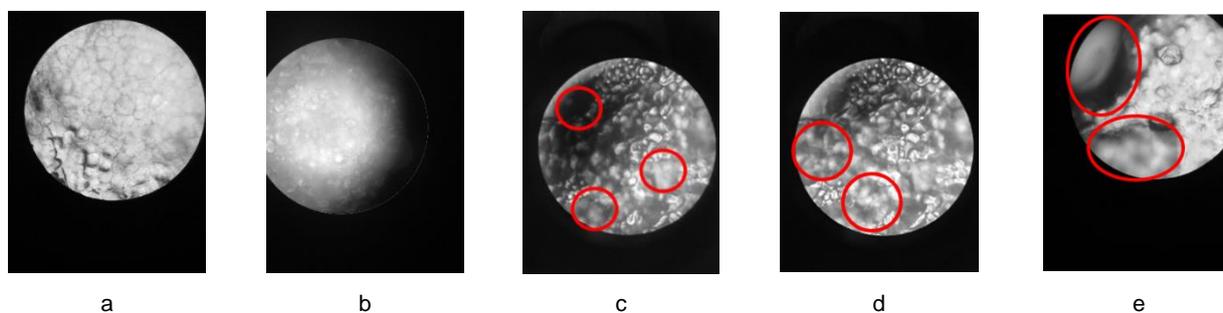


Рис. 2. Характерные структурные изменения образцов картофеля при различных дозах облучения под микроскопом при увеличении в 10^3 крат:
a – не облученный образец; b – 1 кГр; c – 3 кГр; d – 6 кГр; e – 9 кГр

Fig. 2. Specific structural changes of potato samples after different irradiation doses under microscope with 10^3 times magnification:
a – unirradiated sample; b – 1 kGy; c – 3 kGy; d – 6 kGy; e – 9 kGy

Таблица 1. Перечень исследуемых образцов вакуумированного полуфабриката из очищенного и нарезанного картофеля

Table 1. Specification of vacuumized semi-finished product from peeled and diced potatoes

Шифр образца	Концентрация аскорбиновой кислоты, %	Доза облучения, кГр
ОКО (общий контрольный образец)	–	–
1КО	–	1
3КО	–	3
6КО	–	6
9КО	–	9
0А3 (контрольный образец)	3	–
0А6 (контрольный образец)	6	–
0А9 (контрольный образец)	9	–
1А3	3	1
1А6	6	1
1А9	9	1
3А3	3	3
3А6	6	3
3А9	9	3
6А3	3	6
6А6	6	6
6А9	9	6
9А3	3	9
9А6	6	9
9А9	9	9

Все образцы полуфабрикатов оценивались по органолептическим, физико-химическим и микробиологическим показателям. Оценивали внешний вид, цвет, запах, консистенцию картофеля (табл. 2) [26], а также признаки потемнения образцов, наличие запахов озона и продуктов пиролиза.

Определение физико-химических и микробиологических показателей осуществлялось на базе Центра коллективного пользования Института неорганической химии СО РАН и Испытательного лабораторного центра Управления Роспотребнадзора по Новосибирской области соответственно.

Таблица 2. Требования к органолептическим показателям полуфабриката из картофеля

Table 2. Requirements for sensory characteristics of semi-finished product from potatoes

Показатель	Характеристика
Внешний вид	Форма нарезки – кубиком; срез ровный, гладкий, без надломов; окраска – ровная
Цвет	Соответствующий сорту картофеля: белый или светло-желтый
Запах	Свойственный сырому картофелю, крахмалистый
Консистенция	Плотная, твердая, однородная

Для витаминов и микроэлементов исследовалось их количественное содержание. Содержание витамина С определялось стандартным

титриметрическим методом [27]. Содержание витамина РР определялось с помощью ПД-сенсоров на основе перфторированных мембран [28]. Содержание кальция определялось стандартным титриметрическим методом, содержание натрия и калия – пламенно-фотометрическим методом с помощью фотометра Экотест-2020-4 (RS-232), содержание фосфора и марганца – атомно-абсорбционным методом на спектрометре С-302 [29]. Содержание железа и меди определялось колориметрическим методом с помощью колориметра FRU WR18-40 [30].

Испытания на микробиологическую чистоту исследуемых образцов проводились согласно методикам, представленным в работе [31], на базе Испытательного лабораторного центра Управления Роспотребнадзора по Новосибирской области.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Органолептическая оценка. Результаты органолептической оценки образцов полуфабрикатов из картофеля в течение суток после обработки и после семи суток хранения представлены в табл. 3 и 4 соответственно.

По внешнему виду в образцах изменений не наблюдалось. По цвету с увеличением дозы облучения с 3 до 9 кГр в не обработанных аскорбиновой кислотой и образцах с концентрациями кислоты 3 и 6% интенсивность цвета увеличивалась. В отдельных образцах отмечалось появление запаха озона или продуктов реакции пиролиза. Консистенция образцов менялась от плотной твердой до не твердой или мягкой. В образцах с концентрацией аскорбиновой кислоты 9% при дозе облучения до 6 кГр включительно изменений не наблюдалось, что свидетельствовало о сохранности протопектина в образцах согласно исследованиям авторов работ [24, 32, 33]. Следовательно, концентрация аскорбиновой кислоты является сдерживающим фактором влияния ионизирующего излучения на изменение органолептических показателей полуфабрикатов из картофеля.

В процессе хранения образцов неизменными оставались их цвет и консистенция. По внешнему виду отмечено незначительное выделение влаги. Запах озона, присутствующий в образцах после облучения, после 7 суток хранения отсутствовал, запах остальных образцов остался неизменным. При хранении образцов в вакуумной упаковке в охлажденном виде процессы окисления фенолов и пектинообразования проходят медленно. Они незначительны для органолептических показателей, поскольку не влияют на внешний вид образцов полуфабриката.

Определение содержания витаминов, макро- и микроэлементов. Результаты определения содержания витаминов, макро- и микроэлементов в образцах представлены в табл. 5.

Таблица 3. Результаты органолептической оценки образцов полуфабрикатов из картофеля в течение суток после обработки

Table 3. Sensory evaluation of semi-finished products from potato samples within 24 hours after processing

Номер образца	Органолептические характеристики образцов			
	Внешний вид	Цвет	Запах	Консистенция
ОКО	стандартный	стандартный	стандартный	стандартная
1КО	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	появление запаха озона	стандартная
3КО	стандартный	незначительное изменение интенсивности окраски	появление запаха озона	плотная, однородная, не твердая
6КО	стандартный	выраженное увеличение интенсивности окраски	выраженный запах продуктов реакции пиролиза	плотная, однородная, размягченная
9КО	стандартный	выраженное увеличение интенсивности окраски	выраженный запах продуктов реакции пиролиза	плотная, однородная, размягченная
0А3	стандартный	стандартный	стандартный	стандартная
0А6	стандартный	стандартный	стандартный	стандартная
0А9	стандартный	стандартный	стандартный	стандартная
1А3	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	стандартный	стандартная
1А6	стандартный	стандартный	стандартный	стандартная
1А9	стандартный	стандартный	стандартный	стандартная
3А3	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	появление запаха озона	стандартная
3А6	стандартный	стандартный	появление запаха озона	стандартная
3А9	стандартный	стандартный	стандартный	стандартная
6А3	стандартный	незначительное изменение интенсивности окраски	слабый запах продуктов реакции пиролиза	плотная, однородная, не твердая
6А6	стандартный	усиление интенсивности окраски	слабый запах продуктов реакции пиролиза	плотная, однородная, не твердая
6А9	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	слабый запах продуктов реакции пиролиза	стандартная
9А3	стандартный	выраженное увеличение интенсивности окраски	выраженный запах продуктов реакции пиролиза	плотная, однородная, размягченная
9А6	стандартный	выраженное увеличение интенсивности окраски	выраженный запах продуктов реакции пиролиза	плотная, однородная, размягченная
9А9	стандартный	выраженное увеличение интенсивности окраски	слабый запах продуктов реакции пиролиза	плотная, однородная, не твердая

Таблица 4. Результаты органолептической оценки образцов полуфабрикатов из картофеля после семи суток хранения при температуре от 0 до +6 °С

Table 4. Sensory evaluation of semi-finished products from potato samples after 7 days storage at 0...+6 °С

Номер образца	Органолептические характеристики образцов			
	Внешний вид	Цвет	Запах	Консистенция
ОКО	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	стандартный	стандартная
1КО	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	стандартный	стандартная
3КО	стандартный с незначительным выделением влаги	незначительное изменение интенсивности окраски	стандартный	плотная, однородная, не твердая
6КО	стандартный с незначительным выделением влаги	выраженное увеличение интенсивности окраски	выраженный запах продуктов реакции пиролиза	плотная, однородная, размягченная
9КО	стандартный с незначительным	выраженное увеличение интенсивности окраски	выраженный запах продуктов реакции	плотная, однородная,

	выделением влаги		пиролиза	размягченная
0A3	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	стандартный	стандартная
0A6	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	стандартный	стандартная
0A9	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	стандартный	стандартная
1A3	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	стандартный	стандартная
1A6	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	стандартный	стандартная
1A9	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	стандартный	стандартная
3A3	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	стандартный	стандартная
3A6	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	стандартный	стандартная
3A9	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	стандартный	стандартная
6A3	стандартный с незначительным выделением влаги	незначительное изменение интенсивности окраски	слабый запах продуктов реакции пиролиза	плотная, однородная, не твердая
6A6	стандартный с незначительным выделением влаги	усиление интенсивности окраски	слабый запах продуктов реакции пиролиза	плотная, однородная, не твердая
6A9	стандартный с незначительным выделением влаги	стандартный	слабый запах продуктов реакции пиролиза	стандартная
9A3	стандартный с незначительным выделением влаги	выраженное увеличение интенсивности окраски	выраженный запах продуктов реакции пиролиза	плотная, однородная, размягченная
9A6	стандартный с незначительным выделением влаги	выраженное увеличение интенсивности окраски	выраженный запах продуктов реакции пиролиза	плотная, однородная, размягченная
9A9	стандартный с незначительным выделением влаги	выраженное увеличение интенсивности окраски	слабый запах продуктов реакции пиролиза	плотная, однородная, не твердая

Таблица 5. Результаты определения содержания витаминов, макро- и микроэлементов в образцах полуфабриката из картофеля

Table 5. Content of vitamins, macro- and microelements in samples of semi-finished product from potato

Номер образца	Содержание витаминов, макро- и микроэлементов, мг%									
	C	PP	Ca	Na	K	P	Fe	Zn	Cu	Mn
ОКО	20,0±0,02	1,31±0,02	10,0±0,03	5,1±0,02	568,2±0,09	58,2±0,03	0,91±0,02	0,36±0,02	139,7±0,03	0,17±0,01
1КО	20,0±0,02	1,32±0,02	10,2±0,03	4,9±0,03	564,3±0,08	58,1±0,03	0,88±0,02	0,35±0,03	138,7±0,02	0,16±0,01
3КО	18,2±0,02	1,28±0,02	9,9±0,03	5,2±0,03	562,9±0,07	57,9±0,03	0,91±0,02	0,34±0,02	136,8±0,03	0,16±0,01
6КО	17,5±0,02	1,21±0,02	9,6±0,03	4,7±0,02	558,0±0,06	57,1±0,03	0,87±0,03	0,29±0,02	137,2±0,02	0,14±0,01
9КО	15,8±0,02	1,17±0,02	9,6±0,03	4,6±0,02	554,0±0,08	56,9±0,03	0,83±0,02	0,25±0,02	136,1±0,03	0,15±0,01
0A3	20,7±0,02	1,32±0,02	10,1±0,03	5,2±0,02	568,1±0,08	57,9±0,02	0,91±0,02	0,35±0,03	139,8 ±0,03	0,16±0,01
0A6	21,3±0,02	1,28±0,02	10,2±0,03	4,9±0,02	568,2±0,07	57,9±0,02	0,88±0,02	0,34±0,03	139,8±0,03	0,16±0,01
0A9	21,9±0,02	1,29±0,03	10,2±0,02	4,9±0,02	568,3±0,09	57,8±0,02	0,89±0,02	0,35±0,03	137,2±0,03	0,16±0,01
1A3	20,6±0,02	1,29±0,02	10,2±0,03	5,0±0,02	568,4±0,07	58,1±0,02	0,89±0,02	0,33±0,03	138,2±0,03	0,16±0,02
1A6	21,2±0,03	1,3±0,02	10,1±0,02	5,1±0,02	568,1±0,07	57,8±0,03	0,88±0,03	0,34±0,02	137,8±0,03	0,17±0,01
1A9	21,8±0,02	1,31±0,02	10,1±0,03	4,9±0,02	567,9±0,09	57,9±0,02	0,89±0,02	0,35±0,02	139,8±0,02	0,16±0,01
3A3	20,6±0,02	1,29±0,02	10,4±0,02	5,1±0,02	567,9±0,06	58,1±0,03	0,91±0,02	0,37±0,02	137,8±0,02	0,16±0,02
3A6	21,2±0,03	1,3±0,02	10,3±0,02	5,1±0,02	566,8±0,07	57,8±0,02	0,9±0,02	0,36±0,02	138,2±0,03	0,15±0,02
3A9	19,6±0,02	1,31±0,02	10,1±0,02	5,1±0,02	566,2±0,08	57,9±0,03	0,91±0,02	0,36±0,02	137,9±0,03	0,16±0,01
6A3	16,4±0,02	1,26±0,02	8,4±0,02	4,3±0,02	562,7±0,05	56,9±0,03	0,81±0,02	0,31±0,02	131,1±0,03	0,15±0,01
6A6	16,8±0,03	1,25±0,02	8,6±0,02	4,2±0,03	561,6±0,09	56,8±0,02	0,82±0,03	0,32±0,02	131,2±0,02	0,15±0,02
6A9	17,4±0,02	1,27±0,02	9,7±0,02	4,2±0,02	560,8±0,07	56,9±0,03	0,81±0,02	0,33±0,02	131,1±0,02	0,14±0,01
9A3	14,6±0,02	1,25±0,02	8,1±0,02	3,8±0,02	551,2±0,08	55,4 ±0,03	0,8±0,02	0,27±0,02	128,9±0,03	0,13±0,01
9A6	15,2±0,03	1,24±0,02	8,2±0,03	3,7±0,02	549,8±0,07	55,2±0,03	0,81±0,03	0,28±0,02	129,1±0,03	0,14±0,01
9A9	15,7±0,02	1,21±0,02	8,1±0,03	3,7±0,02	548,2±0,07	55,3±0,03	0,82±0,03	0,26±0,02	128,8±0,02	0,14±0,01

С увеличением дозы ионизирующего облучения от 1 до 9 кГр в образцах без добавления аскорбиновой кислоты или с аскорбиновой кислотой концентрацией 3 и 6% наблюдается снижение содержания витамина С от 0,1 до 4,5 мг%. В образцах с аскорбиновой кислотой концентрацией 9% с увеличением дозы облучения от 1 до 9 кГр она снижается от 0,1 до 6,1 мг%. Использование аскорбиновой кислоты является сохраняющим фактором для нативного витамина С, однако при дозе облучения 9 кГр его потери более значительны. Изменение содержания витамина РР, других макро- и микроэлементов незначительны, их можно соотнести с выделением влаги после облучения образцов и при их хранении. В целом аскорбиновая кислота в сочетании с вакуумированием сохраняет содержащиеся в картофеле витамины С и РР, макро- и микроэлементы в большей степени при его обработке ионизирующим излучением.

Определение микробиологических показате-

телей. Результаты определения микробиологических показателей образцов полуфабрикатов в течение суток после обработки и после семи суток хранения представлены в табл. 6 и 7.

При дозе облучения 1 кГр наблюдалось незначительное снижение всех исследуемых групп микроорганизмов, при дозе облучения 3 кГр содержание микроорганизмов снижается в 2–4 раза. При дозе облучения 6 и 9 кГр все микроорганизмы уничтожаются полностью.

В образцах, не обработанных ионизирующим излучением, количество микроорганизмов не менялось или увеличивалось. В образцах, обработанных излучением дозой 1, 3 и 6 кГр, количество исследуемых микроорганизмов менялось в незначительных пределах или не обнаруживалось. В образцах, обработанных излучением дозой 9 кГр, ни один вид исследуемых микроорганизмов обнаружен не был. Стерилизующий эффект ионизирующего излучения в образцах сохранялся в течение семи суток.

Таблица 6. Микробиологические показатели полуфабрикатов из картофеля в течение суток после обработки
Table 6. Microbiological characteristics of semi-finished products from potato samples within 24 hours after processing

Номер образца	Микробиологические показатели образцов			
	КМАФАнМ, КОЕ/г	Плесени, дрожжи, КОЕ/г	БГКП (колиформы) в 1,0 г	Патогенные микроорганизмы, в т.ч. Salmonella, в 25,0 г
Нормативное значение	$2,8 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^2$	не допускаются	не допускаются
ОКО	$2,8 \cdot 10^2$	менее 10	обнаружены	не обнаружены
1КО	$2,1 \cdot 10^2$	менее 10	обнаружены	не обнаружены
3КО	$0,5 \cdot 10^2$	менее 4	обнаружены	не обнаружены
6КО	не обнаружены	менее 2	не обнаружены	не обнаружены
9КО	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены
0А3	$2,9 \cdot 10^2$	менее 10	обнаружены	не обнаружены
0А6	$2,8 \cdot 10^2$	менее 10	обнаружены	не обнаружены
0А9	$2,9 \cdot 10^2$	менее 10	обнаружены	не обнаружены
1А3	$2,0 \cdot 10^2$	менее 10	обнаружены	не обнаружены
1А6	$2,0 \cdot 10^2$	менее 10	обнаружены	не обнаружены
1А9	$2,1 \cdot 10^2$	менее 10	обнаружены	не обнаружены
3А3	$0,5 \cdot 10^2$	менее 8	обнаружены	не обнаружены
3А6	$0,6 \cdot 10^2$	менее 7	обнаружены	не обнаружены
3А9	$0,4 \cdot 10^2$	менее 7	обнаружены	не обнаружены
6А3	не обнаружены	менее 6	не обнаружены	не обнаружены
6А6	не обнаружены	менее 6	не обнаружены	не обнаружены
6А9	не обнаружены	менее 5	не обнаружены	не обнаружены
9А3	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены
9А6	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены
9А9	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены

Таблица 7. Микробиологические показатели полуфабрикатов из картофеля после семи суток хранения при температуре от 0 до +6 °С

Table 7. Microbiological characteristics of semi-finished products from potato samples after 7 days of storage at 0...+6 °С

Номер образца	Микробиологические показатели образцов			
	Плесени, дрожжи, КОЕ/г	Плесени, дрожжи, КОЕ/г	БГКП (колиформы) в 1,0 г	Патогенные микроорганизмы, в т.ч. Salmonella, в 25,0 г
Нормативное значение	$2,8 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^2$	не допускаются	не допускаются
ОКО	$3,4 \cdot 10^2$	менее 10	обнаружены	не обнаружены
1КО	$2,3 \cdot 10^2$	менее 10	обнаружены	не обнаружены
3КО	$0,6 \cdot 10^2$	менее 4	обнаружены	не обнаружены
6КО	не обнаружены	менее 2	не обнаружены	не обнаружены
9КО	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены
0А3	$3,6 \cdot 10^2$	менее 10	обнаружены	не обнаружены
0А6	$3,5 \cdot 10^2$	менее 10	обнаружены	не обнаружены
0А9	$3,6 \cdot 10^2$	менее 10	обнаружены	не обнаружены

1А3	2,2·10 ²	менее 10	обнаружены	не обнаружены
1А6	2,3·10 ²	менее 10	обнаружены	не обнаружены
1А9	2,4·10 ²	менее 10	обнаружены	не обнаружены
3А3	0,6·10 ²	менее 8	обнаружены	не обнаружены
3А6	0,7·10 ²	менее 7	обнаружены	не обнаружены
3А9	0,6·10 ²	менее 7	обнаружены	не обнаружены
6А3	не обнаружены	менее 6	не обнаружены	не обнаружены
6А6	не обнаружены	менее 6	не обнаружены	не обнаружены
6А9	не обнаружены	менее 5	не обнаружены	не обнаружены
9А3	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены
9А6	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены
9А9	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены	не обнаружены

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что при воздействии ионизирующего излучения на образцы очищенного вакуумированного картофеля с увеличением дозы излучения от 1 до 9 кГр наблюдалось изменение консистенции от плотной до размягченной, увеличение интенсивности окраски поверхности и запаха продуктов пиролиза. Сочетание ТГ и ДСК методов исследования образцов ПЭТ-пакетов при облучении дозой 9 кГр, где суммарная масса атомных единиц ПЭТ-материала указывает на следы присутствия летучих веществ, позволяет

сказать об отсутствии воздействия ионизирующего излучения на полимер. Применение аскорбиновой кислоты в виде раствора концентрацией 9% для обработки поверхности очищенного картофеля обусловлено необходимостью предотвратить размягчение его консистенции и изменение окраски поверхности при облучении дозой до 6 кГр. При этом достигается микробиологическая чистота полуфабриката и сохраняемость витаминов С и РР при воздействии от 1 до 6 кГр, колеблющееся в пределах 3%. При дозе от 6 до 9 кГр потери исследуемых витаминов варьируются в пределах 25%.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Санжарова Н.И., Молина А.А., Козьмин Г.В., Кобялко В.О. Радиационные агробιοтехнологии: приоритетные направления развития и коммерциализации // Аграрная наука. 2016. N 1. С. 2–4.
2. Алимов А.С., Близнюк У.А., Борщеговская П.Ю., Еланский С.Н., Черняев А.П., Юров Д.С. Ингибирование прорастания клубней картофеля при воздействии электронного пучка с энергией 1 МэВ // Защита картофеля. 2015. N 1. С. 26–29.
3. Лой Н.Н., Санжарова Н.И., Губарева О.С., Чиж Т.В., Гулина С.М. Применение радиационных технологий при хранении картофеля // Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия. 2018. Т. 20. С. 66–71. <https://doi.org/10.30679/2587-9847-2018-20-66-71>
4. Цыгвинцев П.Н. Торможение физиологических процессов в клубнях картофеля после облучения // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2018. N 11-2. С. 341–346.
5. Ян ван Козей. Лучевая обработка пищевых продуктов // Бюллетень МАГАТЭ. 1981. Т. 23. N 3. С. 37–41.
6. Kumar S., Petwal V.C., Kaul A., Behere A., Promod R., Varma S.C., et al. Sprout inhibition in potato (*Solanum tuberosum* L.) with low energy electrons // Journal of Food Science and Technology – Mysore. 2009. Vol. 46. Issue 1. P. 50–53.
7. Mahto R., Das M. Effect of gamma irradiation on the physico-mechanical and chemical properties of potato (*Solanum tuberosum* L.), cv. “Kufri Sindhuri”, in non-refrigerated storage conditions // Postharvest Biology and Technology. 2014. Vol. 92. P. 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.01.011>
8. Mahto R., Das M. Effect of γ irradiation on the physico-mechanical and chemical properties of potato (*Solanum tuberosum* L), cv. “Kufri Chandramukhi” and “Kufri Jyoti”, during storage at 12 °C // Radiation Physics and Chemistry. 2015. Vol. 107. P. 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2014.08.021>
9. Peivaste I., Alahyarizadeh G. Comparative study on absorbed dose distribution of potato and onion in X-ray and electron beam system by MCNPX2.6 code // MAPAN – Journal of Metrology Society of India. 2019. Vol. 34. Issue 1. P. 19–29. <https://doi.org/10.1007/s12647-018-0287-z>
10. Soares G.M.I., da Silva E.B., Amaral A.J., Machado E.C.L., Silva J.M. Physico-chemical and sensory evaluation of potato (*Solanum tuberosum* L.) after irradiation // Anais da Academia Brasileira de Ciências (Annals of the Brazilian Academy of Science). 2016. Vol. 88. Issue 2. P. 941–950. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620140617>
11. Tripathi J., Variyar P.S., Singhal R.S., Sharma A. Radiation processing for sprout inhibition of stored potatoes and mitigation of acrylamide in fries and chips. In: Processing and Impact on Active Components in Food. 2015. Chapter 11. P. 89–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00011-1>
12. Тихонов А.В., Деревягина М.К., Васильева С.В., Зейрук В.Н. Радиационные методы обработки клубней картофеля // Защита картофеля. 2015. N 1. С. 22–25.
13. Seth R.K., Zarin M., Khan Z., Seth R. Ionizing radiation as a phytosanitary treatment against *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae) // Florida Entomologist. 2016. Vol. 99. Special issue 2. P. 76–87.

14. Kim H.-J., Song H.-J., Song K.-B. Microbial growth and sensory quality of dried potato slices irradiated by electrons // *Radiation Physics and Chemistry*. 2011. Vol. 80. Issue 6. P. 776–777. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2011.02.016>
15. Докучаева И.С., Гумерова Г.Х., Хакимова Е.Г. Проблемы технологии лучевой стерилизации пищевых продуктов // *Вестник технологического университета*. 2016. Т. 19. N 17. С. 169–171.
16. Al-juhaimi F., Ghaafoor K., Özcan M.M., Jahurul M.H.A., Babiker E.E., Jinap S., et al. Effect of various food processing and handling methods on preservation of natural antioxidants in fruits and vegetables // *Journal of Food Science and Technology*. 2018. Vol. 55. Issue 10. P. 3872–3880. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3370-0>
17. Mulinacci N., Valletta A., Pasqualetti V., Innocenti M., Giuliani C., Bellumori M., et al. Effects of ionizing radiation on bio-active plant extracts useful for preventing oxidative damages // *Natural Product Research*. 2019. Vol. 33. Issue 8. P. 1106–1114. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1457663>
18. Klaassen M.T., Trindade L.M. RG-I galactan side-chains are involved in the regulation of the water-binding capacity of potato cell walls // *Carbohydrate Polymers*. 2020. Vol. 227. Article 115353. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115353>
19. Радиационные технологии в сельском хозяйстве и пищевой промышленности; под общ. ред. Г.В. Козьмина, С.А. Гераськина и Н.И. Санжаровой. Обнинск: ВНИИРАЭ, 2015. 400 с.
20. Graham W.D., Stevenson M.H. Effect of irradiation, storage and cooking on vitamin C in strawberries and potatoes // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1997. Vol. 75. Issue 3. P. 317–377. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199711\)75:3<371::AID-JSFA890>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199711)75:3<371::AID-JSFA890>3.0.CO;2-P)
21. Алёшин В.Н., Ачмиз А.Д., Першакова Т.В., Купин Г.А., Павлова В.Е. Применение радиационных агробiotехнологий при хранении и переработке растительного сырья // *Научный журнал КубГАУ*. 2018. N 136. С. 22–35. <https://doi.org/10.21515/1990-4665-136-003>
22. Pikaev A.K. Contribution of radiation technology to environmental protection // *High Energy Chemistry*. 2002. Vol. 36. Issue 3. P. 135–146. <http://doi.org/10.1023/A:1015384631830>
23. Китиева Л.И., Саламов А.Х., Арчакова Р.Д., Ужахова Л.Я., Ялхорова М.А. Исследование свойств ПЭТ-упаковки в процессе эксплуатации // *Вестник современной науки*. 2016. N 4–1 (16). С. 28–32.
24. Куткина М.Н., Котова Н.П., Елисеева С.А. Совершенствование технологии универсальных овощных полуфабрикатов для предприятий индустрии питания // *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*. 2016. N 2 (68). С. 153–157. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2016-2-153-157>
25. Sapers G.M., Cooke P.H., Heidel A.E., Martin S.T., Miller R.L. Structural changes related to texture of pre-peeled potatoes // *Journal of Food Science*. 1997. Vol. 62. Issue 4. P. 797–803. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15458.x>
26. Чугунова О.В. Научный обзор: сенсорный анализ и его значение в оценке качества и безопасности пищевых продуктов // *Научное обозрение. Технические науки*. 2016. N 3. С. 118–129.
27. Голубкина Н.А., Кошелева О.В. Определение витамина С в пищевых продуктах // *Журнал аналитической химии*. 1989. Т. 44. N 8. С. 1349–1360.
28. Parshina A.V., Bobreshova O.V. PD-sensors based on perfluorinated membranes for simultaneous determination of vitamins B₁, B₆, and PP in aqueous solutions // *Petroleum Chemistry*. 2014. Vol. 54. Issue 8. P. 631–636. <https://doi.org/10.1134/S096554411408012X>
29. Luis G., Rubio C., Gutierrez A.J., Gonzalez-Weller D., Revert C., Hardisson A. Evaluation of metals in several varieties of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.): comparative study // *Environmental Monitoring and Assessment*. 2014. Vol. 186. Issue 1. P. 433–440. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3388-8>
30. Xia X., Zhang D., Fan C., Pu S. Naked-eye detection of Cu (II) and Fe (III) based on a Schiff Base Ruthenium complex with nicotinohydrazide // *Applied Organometallic Chemistry*. 2020. Vol. 34. Issue 10. Article e5841. <https://doi.org/10.1002/aoc.5841>
31. Шевелева С.А., Ефимочкина Н.Р., Быкова И.Б., Батищева С.Ю. Обоснование микробиологических показателей безопасности для новых видов пищевой продукции // *Вопросы питания*. 2014. Т. 83. N S3. С. 162–163.
32. Hrabovska O., Pastukh H., Demenyuk O., Miroshnyk V., Halatenko T., Babii A., et al. Kinetics of hydrolysis-extraction of pectin substances from the potato raw materials // *Ukrainian Food Journal*. 2015. Vol. 4. Issue 4. P. 596–604.
33. Pavlyuk R., Pogarska V., Kotuyk T., Pogarskiy A., Loseva S. The influence of mechanical activation on the formation of nanocomplexes of heteropolysaccharides and proteins of plant biosystems in developing of nanotechnologies // *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2016. Vol. 3. Issue 11 (81). P. 33–40. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2016.70996>

REFERENCES

1. Sanzharova NI, Molina AA, Koz'min GV, Kobyalko VO. Radiation agricultural biotechnologies: priority areas for the development and commercialization. *Agrarnaya nauka = Agrarian science*. 2016;1:2–4. (in Russian)
2. Alimov AS, Bliznuk UA, Borschegovskaya PY, Elansky SN, Chernyaev AP, Yurov DS. Germination inhibition of potato tubers under the influence of the

electron beam with energy of 1 MeV. *Zashchita kartofelya*. 2015;1:26–29. (In Russian)

3. Loy NN, Sanzharova NI, Gubareva OS, Chizh TV, Gulina SN. Application of radiation technologies in potato storage. *Nauchnye trudy Severo-Kavkazskogo federal'nogo nauchnogo tsentra sadovodstva, vinogradarstva, vinodeliya*. 2018;20:66–71. (in Russian) <https://doi.org/10.30679/2587-9847-2018-20-66-7>

4. Tsygvintsev PN. Inhibition of physiological processes in potato clubs after irradiation. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2018;11-2;341–346. (in Russian)

5. Yan van Koei. Radiation processing of food products. *Byulleten' MAGATE*. 1981;23(3):37–41. (In Russian)

6. Kumar S, Petwal VC, Kaul A, Behere A, Pro-mod R, Bapna SC, et al. Sprout inhibition in potato (*Solanum tuberosum* L.) with low energy electrons. *Journal of Food Science and Technology – Mysore*. 2009;46(1):50–53.

7. Mahto R, Das M. Effect of gamma irradiation on the physico-mechanical and chemical properties of potato (*Solanum tuberosum* L.), cv. “Kufri Sindhuri”, in non-refrigerated storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*. 2014;92:37–45. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.01.011>

8. Mahto R, Das M. Effect of γ irradiation on the physico-mechanical and chemical properties of potato (*Solanum tuberosum* L), cv. “Kufri Chandramukhi” and “Kufri Jyoti”, during storage at 12 °C. *Radiation Physics and Chemistry*. 2015;107:12–18. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2014.08.021>

9. Peivaste I, Alahyarizadeh G. Comparative study on absorbed dose distribution of potato and onion in X-ray and electron beam system by MCNPX2.6 code. *MAPAN – Journal of Metrology Society of India*. 2019;34(1):19–29. <https://doi.org/10.1007/s12647-018-0287-z>

10. Soares GMI, da Silva EB, Amaral AJ, Machado ECL, Silva JM. Physico-chemical and sensory evaluation of potato (*Solanum tuberosum* L.) after irradiation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências = Annals of the Brazilian Academy of Science*. 2016;88(2):941–950. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620140617>

11. Tripathi J, Variyar PS, Singhal RS, Sharma A. Radiation processing for sprout inhibition of stored potatoes and mitigation of acrylamide in fries and chips. In: *Processing and Impact on Active Components in Food*. 2015. Chapter 11. p. 89–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00011-1>

12. Tikhonov AV, Derevyagina MK, Vasileva SV, Zeiruk VN. Radiological methods for treatment of potato tubers in storage. *Zashchita kartofelya*. 2015;1:22–25. (In Russian)

13. Seth RK, Zarin M, Khan Z, Seth R. Ionizing radiation as a phytosanitary treatment against *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Florida Entomologist*. 2016;99(2):76–87.

14. Kim H-J, Song H-J, Song K-B. Microbial growth and sensory quality of dried potato slices irradiated by electrons. *Radiation Physics and Chemistry*. 2011;80(6):776–777. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2011.02.016>

15. Dokuchaeva IS, Gumerova GK, Khakimova EG. Problems of food irradiation sterilization technology. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta*. 2016;9(17):169–171. (In Russian)

16. Al-juhaimi F, Ghaafoor K, Özcan MM, Jahurul MHA, Babiker EE, Jinap S, et al. Effect of various food processing and handling methods on preservation of natural antioxidants in fruits and vegetables. *Journal of Food Science and Technology*. 2018;55(10):3872–3880. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3370-0>

17. Mulinacci N, Valletta A, Pasqualetti V, Innocenti M, Giuliani C, Bellumori M, et al. Effects of ionizing radiation on bio-active plant extracts useful for preventing oxidative damages. *Natural Product Research*. 2019;33(8):1106–1114. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1457663>

18. Klaassen MT, Trindade LM. RG-I galactan side-chains are involved in the regulation of the water-binding capacity of potato cell walls. *Carbohydrate Polymers*. 2020;227. Article 115353. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115353>

19. Koz'min GV, Geras'kin SA, Sanzharova NI. (ed.). *Radiation technologies in agriculture and food industry*. Obninsk: VNIIRAE; 2015. 400 p. (In Russian)

20. Graham WD, Stevenson MH. Effect of irradiation, storage and cooking on vitamin C in strawberries and potatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1997;75(3):371–377. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199711\)75:3<371:AID-JSFA890>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199711)75:3<371:AID-JSFA890>3.0.CO;2-P)

21. Aleshin VN, Achmiz AD, Pershakova TV, Kupin GA, Pavlova VE. Use of radioactive agrobiotechnologies in storing and processing of plant materials. *Nauchnyi zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU*. 2018;136:22–35. (In Russian) <https://doi.org/10.21515/1990-4665-136-003>

22. Pikaev AK. Contribution of radiation technology to environmental protection. *High Energy Chemistry*. 2002;36(3):135–146. <http://doi.org/10.1023/A:1015384631830>

23. Kitieva LI, Salamov AH, Archakova RDzh, Uzhahova LJa, Jalhoroeva MA. Investigation of pet-packaging in operation. *Vestnik sovremennoi nauki*. 2016;4-1:28–32. (In Russian)

24. Kutkina MN, Kotova NP, Eliseeva SA. Improving technology universal vegetable semi-finished products for the enterprises of food industry. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologii = Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2016;2:153–157. (In Russian) <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2016-2-153-157>

25. Sapers GM, Cooke PH, Heidel AE, Martin ST, Miller RL. Structural changes related to texture

of pre-peeled potatoes. *Journal of Food Science*. 1997;62(4):797–803. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15458.x>

26. Chugunova OV. Scientific review: analysis of touch and its significance in the evaluation of quality and food safety. *Nauchnoe obozrenie. Tekhnicheskije nauki*. 2016;3:118–129. (In Russian)

27. Golubkina NA, Kosheleva OV. Methods of vitamin C determination in food. *Zhurnal analiticheskoi khimii = The Journal of Analytical Chemistry*. 1989;44(8):1349–1360. (In Russian)

28. Parshina AV, Bobreshova OV. PD-sensors based on perfluorinated membranes for simultaneous determination of vitamins B₁, B₆, and PP in aqueous solutions. *Petroleum Chemistry*. 2014;54(8):631–636. <https://doi.org/10.1134/S096554411408012X>

29. Luis G, Rubio C, Gutierrez AJ, Gonzalez-Weller D, Revert C, Hardisson A. Evaluation of metals in several varieties of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.): comparative study. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2014;186(1):433–440. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3388-8>

30. Xia X, Zhang D, Fan C, Pu S. Naked-eye detection of Cu (II) and Fe (III) based on a Schiff Base Ruthenium complex with nicotinohydrazide. *Applied Organometallic Chemistry*. 2020;34(10):e5841. <https://doi.org/10.1002/aoc.5841>

31. Sheveleva SA, Efimochkina NR, Bykova IB, Batishcheva SYu. Justification of microbiological safety indicators for new types of food products. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 2014;83(S3):162–163. (In Russian)

32. Hrabovska O, Pastukh H, Demenyuk O, Miroshnyk V, Halatenko T, Babii A, et al. Kinetics of hydrolysis-extraction of pectin substances from the potato raw materials. *Ukrainian Food Journal*. 2015;4(4):596–604.

33. Pavlyuk R, Pogarska V, Kotuyk T, Pogarskiy A, Loseva S. The influence of mechanolysis on the activation of nanocomplexes of heteropolysaccharides and proteins of plant biosystems in developing of nanotechnologies. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2016;3(11):33–40. (In Russian) <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2016.70996>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Дриль Анастасия Александровна,
старший преподаватель кафедры технологии
и организации пищевых производств,
Новосибирский государственный технический
университет,
630073, г. Новосибирск, пр-т К. Маркса, 20,
Российская Федерация,
✉ e-mail: drilnaska@gmail.com

Сапожников Александр Николаевич,
к.т.н., доцент кафедры технологии
и организации пищевых производств
Новосибирский государственный технический
университет
630073, г. Новосибирск, пр-т К. Маркса, 20,
Российская Федерация,
e-mail: alexnsk@ya.ru

Заявленный вклад авторов

Оба автора сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

*Статья поступила в редакцию 22.08.2020;
одобрена после рецензирования 01.11.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anastasiia A. Dril,
Senior Lecturer,
Technology and Organization
of Food Industries Department,
Novosibirsk State Technical University,
20, K. Marks Ave., Novosibirsk, 630073,
Russian Federation
✉ e-mail: drilnaska@gmail.com

Aleksandr N. Sapozhnikov
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Technology and Organization
of Food Industries Department,
Novosibirsk State Technical University,
20, K. Marks Ave., Novosibirsk, 630073,
Russian Federation
e-mail: alexnsk@ya.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

*The article was submitted 22.08.2020;
approved after reviewing 01.11.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 543.421:424:664.788

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-678-690>



Инфракрасная Фурье-спектроскопия в сравнительном исследовании животных и растительных белков

© А.П. Нечипоренко*, И.Э. Миневич**, С.М. Орехова*, В.Е. Ситникова*,
Д.А. Громова*, М.В. Успенская*

*Национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики,
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Федеральный научный центр лубяных культур, г. Тверь, Российская Федерация

Резюме: Методом инфракрасной спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения проведено сравнительное исследование белков разной категории (саркоплазматических, миофибриллярных, стромы) мышечной ткани свинины; глобулярных белков, полученных из промышленного жмыха и измельченных семян льна масличного, а также протеин-полисахаридных комплексов, извлеченных из обрушенной семенной оболочки и цельных семян. Выделение белковых компонентов проводили из водно-солевых экстрактов осаждением трехкратным избытком 96%-го этанола, 5%-й трихлоруксусной кислотой и ИЭТ-осаждением при $pH = 4,2$. Показано, что использование разных анатомических частей (обрушенное ядро и семенная оболочка) как цельных, измельченных форм, так и жмыха семян льна масличного при варьировании условий предварительной обработки, экстрагирования и выделения позволяет получать комплекс биологически активных протеинсодержащих продуктов, используемых в пищевой промышленности, медицине, фармакопее, косметологии – белковые концентраты, пептид-полисахариды, белок-липид-полисахаридные комплексы с варьируемым составом и соотношением компонентов. Сравнительное исследование кинетики воздушной сушки при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ сырых растительных и животных глобулярных белков позволило отметить идентичность в экстремальном характере изменения спектрального образа кривых светопоглощения и интенсивности основных характеристических полос по мере удаления влаги. Температурный фактор, оказывая влияние на общий вид спектра, приводит к деформации полосы Амид-I, несущей информацию о структуре белка. Вклад в деформационные изменения может внести не только возможность дифференциации глобулярных белков (альбуминов и глобулинов), но и упаковка их полипептидных цепей при реконструкции или формировании новой вторичной структуры, разрушенной в результате различных механических и химических вмешательств. Комплекс полученных данных указывает, что повышенная температура оказывает существенное влияние на структурно-конформационные преобразования как белковых концентратов, так и белок-полисахаридных комплексов независимо от их природы.

Ключевые слова: растительные и животные белки, протеинсодержащие продукты, инфракрасная спектроскопия отражения

Для цитирования: Нечипоренко А.П., Миневич И.Э., Орехова С.М., Ситникова В.Е., Громова Д.А., Успенская М.В. Инфракрасная Фурье-спектроскопия в сравнительном исследовании животных и растительных белков. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 4. С. 678–690. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-678-690>

Fourier-transform infrared spectroscopy in a comparative study of animal and plant proteins

Alla P. Nechiporenko*, Irina E. Minevich**, Svetlana M. Orehova*,
Vera E. Sitnikova*, Diana A. Gromova*, Mayya V. Uspenskaya*

*National Research University of Information Technology, Mechanics and Optic,
St. Petersburg, Russian Federation

** Federal Scientific Center for Fiber Crops, Tver, Russian Federation

Abstract: The method of infrared attenuated total reflection spectroscopy was used to compare proteins (sarcolemmic, myofibrillar, stroma) contained in the pork muscle tissue, globular proteins obtained from industrially crushed flax seeds, as well as protein-polysaccharide complexes extracted from husked seed coats and whole seeds. Protein components were isolated from saline solutions by precipitation with a threefold excess of 96% ethanol and 5% trichloroacetic acid, as well as by isoelectric precipitation at $pH = 4.2$. It is

shown that the use of different anatomical parts (core and seed coat), including crushed or whole forms and flax seed meal, under varying conditions of pre-treatment, extraction and isolation allow biologically active protein-containing products to be obtained. Such products – protein concentrates, peptide polysaccharides and protein-lipid-polysaccharide complexes with a variable composition and ratio of components – are valuable raw materials for the food industry, medicine, pharmacopoeia and cosmetology. A comparative study of the kinetics of air drying of crude plant and animal globular proteins at 20°C showed these proteins to be similar in terms of extreme changes in the spectra of light absorption curves and the intensity of the main characteristic bands upon moisture removal. Temperature changes, affecting the general appearance of light absorption spectra, lead to deformation of the Amide-I band, which carries information about the protein structure. Deformational changes may be promoted not only by differentiation of globular proteins (albumins and globulins), but also by packing of their polypeptide chains during reconstruction or formation of a new secondary structure destroyed as a result of various mechanical and chemical interventions. According to the obtained data, elevated temperatures have a significant effect on the structural transformations of both protein concentrates and protein-polysaccharide complexes, regardless of their nature.

Keywords: plant and animal proteins, protein-containing products, infrared reflection spectroscopy

For citation: Nechiporenko AP, Minevich IE, Orekhova SM, Sitnikova VE, Gromova DA, Uspenskaya MV. Fourier-transform infrared spectroscopy in a comparative study of animal and plant proteins. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4): 678–690. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-678-690>

ВВЕДЕНИЕ

Недостаточное содержание белка в продуктах питания – проблема мирового масштаба, давно назревавшая и ставшая сегодня очевидной [1, 2]. Потребности пищевой индустрии в производстве продукции не только обогащенной белками, но и с широким разнообразием состава по белковым и аминокислотным компонентам, функционально-терапевтическим и технологическим свойствам довольно велики [3, 4]. Во многих лабораториях мира решение этой проблемы рассматривается и исследуется в нескольких направлениях: введение в состав мясных продуктов добавок мяса диких животных и птицы (буйвола, зубра, оленя, лося, кабана, медведя, фазана, куропатки и др.) [5, 6], нетрадиционного мясного сырья (мясо верблюда, яка, кенгуру и др.) [7, 8], для других категорий продуктов питания – белковых ингредиентов животного и растительного происхождения [9]. По мнению ряда ведущих в данной отрасли российских и зарубежных ученых, комплексное использование белков животного происхождения из мяса сельскохозяйственных, диких животных и нетрадиционного сырья при производстве потребительских товаров является одним из альтернативных путей решения проблемы дефицита белка в питании населения [3, 5, 7].

С каждым годом увеличивается потребность в белках и аминокислотах в медицине, фармакопее, ветеринарии, животноводстве. Белки и продукты их деградации (пептиды, аминокислоты) широко применяются в клинической практике в качестве и в составе медицинских препаратов, лечебных пищевых добавок, для питания ослабленных больных, при кровопотерях, нарушении мозгового кровообращения, умственной отсталости, потери памяти и др. К белковым препара-

там относятся и всевозможные лечебные сыворотки. Наряду с синтетическими и нефтяными белками во многих странах интенсивно развиваются крупнотоннажные технологии получения биомассы из культур некоторых микроорганизмов, которые находят применение в производстве кормовых добавок для животноводства, биоинсектицидов, вакцинных штаммов микроорганизмов и вирусов, заквасок, дрожжей¹. Оказалось, что микробный белок богат незаменимыми аминокислотами (лизин, треонин, триптофан, метионин, изолейцин, фенилаланин, тирозин). Белки микробного происхождения в настоящее время применяются вместо сои и рыбной муки. Однако существенным недостатком этих технологий является наличие в конечном продукте нежелательных примесей микробных клеток.

Остро стоящая проблема нехватки пищевого белка стимулирует работу генетиков и селекционеров и широкомасштабное исследование сырья растительного происхождения, богатого протеинами, интерес к в последнее десятилетие резко возрос [10–12]. Белки растительного происхождения получают в основном из семян злаков и масличных культур, плодов бобовых и ореховых растений. В большинстве случаев белки из растительных источников являются преимущественно альбуминами и глобулинами и, в отличие от животных, характеризуются относительным дефицитом некоторых незаменимых аминокислот [13]. Так, например, кукуруза и пшеница бедны триптофаном и лизином, а некоторые бобовые – метионином. В результате каждый из этих продуктов сам по себе имеет низкую питательную ценность, однако, в совокупности они дают белковую смесь, эквивалентную по питательности белкам молока, обеспечивая полноценный набор необходимых аминокислот. Такие

¹Воробьева А.И. Промышленная микробиология: учеб. пособие. М.: Изд-во МГУ. 1989. 294 с.

белки рассматриваются как комплементарные.

Одним из перспективных растительных источников полноценного белка, полипептидов и их полисахаридных комплексов, вызывающих научный и практический интерес, являются семена льна и продукты их переработки [14–16]. Согласно литературным данным, по аминокислотному составу белки льна аналогичны белкам сои, которые рассматриваются как одни из самых питательных растительных белков, и по показателю аминокислотного сора не уступают белкам молока. Семена льна содержат полный набор наиболее часто встречающихся аминокислот и характеризуются высоким содержанием таких незаменимых аминокислот, как валин, изолейцин, фенилаланин, лизин, лейцин, при низком содержании метионина и треонина. Различия в аминокислотном составе, указывая на комплементарность, дают возможность перспективного комбинирования при купажировании белковых систем целевого назначения. Следует отметить перспективность применения в качестве источника белка льняного жмыха, содержание белка в котором (35–45%) в 1,5–2 раза превышает содержание белка в семенах. В семенах льна с увеличением содержания масла уменьшается содержание белка, а его состав может варьироваться в зависимости от генетики, условий выращивания, сбора и обработки.

Выделение белков как животного, так и растительного происхождения происходит в несколько этапов. Сначала белки из измельченного сырьевого материала, обезжиренного при помощи гексана, диэтилового или петролейного эфира, переводят в растворимое состояние, используя в качестве экстрагентов воду, водные растворы солей, буферные растворы и др. [17, 18]. Однако, поскольку в экстракт выходят и сопутствующие растворимые продукты, следующим этапом, чаще всего, является осаждение белка водоотнимающими средствами (этанол, ацетон), солевыми растворами (Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) высокой концентрации, минеральными и органическими кислотами, осаждением в изоэлектрической точке (ИЭТ-осаждение) и др. Конечные свойства продуктов, образующихся в ходе многоэтапных технологических процессов, являются результатом разнообразных структурных действий, сшивок, реконструкций и сложных взаимодействий всех компонентов. На индивидуальность характера деструктивно-реконструктивных процессов и возможности при структурной агломерации существенное влияние оказывают такие технологические параметры, как температура, рН среды, продолжительность процесса. Поэтому выбор схемы конкретного технологического процесса зависит от вида сырья и назначения целевого продукта.

Цель настоящей работы состояла в сравнительном исследовании растительных белковых концентратов, протеин-полисахаридных комплексов (семена льна) и животных белков разных категорий мышечной ткани (свинина) с использованием метода инфракрасной спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (ИКС НПВО), широко используемого при исследовании биологических материалов [19–21].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования в данной работе являлись:

1. Фракционированные саркоплазматические, миофибриллярные белки и белки стромы, выделенные из измельченной ($d = 2,5$ мм) свежее охлажденной препарированной мышечной ткани свинины (длиннейшая мышца спины, белая порода, фермерское производство Новгородской области). Выделение белков разной категории, основанное на иерархической последовательности в их растворимости² [22], проводилось на холоде по схемам:

– саркоплазматические глобулярные белки (альбумины, глобулины) выделяли из мышечной ткани водной экстракцией в течение 4-х ч; гидромодуль $= m(\text{г})/V(\text{мл}) = 1/10$;

– миофибриллярные сократительные белки актомиозинового комплекса (актин, миозин, тропомиозин) извлекали из мышечного волокна, оставшегося после удаления саркоплазматических веществ и отмытого до прозрачных вод, экстракцией в течение 2-х ч 10% раствором NaCl;

– фибриллярные соединительнотканые белки (коллаген, эластин) получали из отмытой до прозрачных вод стромы (соединительной ткани) обработкой 0,6 М раствором NaOH для удаления мукополисахаридов (углеводной компоненты стромы) с последующей отмывкой водой;

– водный и солевой экстракты использовали для осаждения саркоплазматических и миофибриллярных белков трехкратным избытком 96%-го этанола и 5%-й трихлоруксусной кислотой.

2. Протеин-полисахаридные комплексы и концентраты белков (альбумины, глобулины, глютенины) из масличных семян льна промышленного отечественной селекции (ГОСТ 10582-76) получали следующим образом:

– протеин-полисахаридные комплексы извлекали водной и водно-солевой экстракцией при 40–45 °С и рН = 6,0 в течение 120 мин из цельных семян льна и обрушенной семенной оболочки;

– белковые концентраты получали из обрушенных ядер и промышленного льняного жмыха экстракцией 7%-м раствором NaCl в соотношении

²Соколов А.А. Физико-химические и биохимические основы технологии мясopодуктов. М.: Пищевая промышленность, 1965. 511 с.

1:20 при pH реакционной смеси 8–9, которое устанавливалось введением небольшими порциями 10%-го раствора NaOH при температуре 35–40 °С. Продолжительность процесса экстракции – 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры экстракты центрифугировали и отделяли от льняного жмыха;

– из экстракта белок осаждали при pH = 4,2 (ИЭТ-осаждение) добавлением раствора HCl или трехкратным избытком 96%-го этанола. Для «созревания» белковой массы систему выдерживали 40 мин и центрифугировали.

Отделенный центрифугированием от надосадочного раствора растительный и животный сырой белок сушили при 45–50 °С в термостате или 20 °С на предметном столике прибора до стабилизации ИК-спектра. Колебательные спектры образцов (32 скана) получали методом ИК-спектроскопии на Фурье-спектрометре Tensor 37 (Bruker, Германия) с алмазным НРВО-элементом и программным пакетом OPUS со стандартными градуировочными возможностями в диапазоне частот 4000–600 см⁻¹ в формате поглощения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования животных белков, представленные в литературе, были получены, как правило, на лиофилизированных препаратах. Современный способ сублимационной сушки при низких отрицательных температурах является наиболее бережной, мягкой технологией и широ-

ко используется в разных сферах пищевых производств. В фармацевтической и медицинской практике – при производстве лечебных, профилактических и диагностических препаратов (вакцин, антибиотиков), консервировании препаратов плазмы, сыворотки крови, кровезаменителей, при создании «банков» сухих препаратов и др. [23, 24].

Сопоставление общего вида кривых 1–3 (рис. 1) для лиофилизированных образцов альбуминов животного происхождения, несмотря на различие в интенсивности полос и относительное расположение, показывает их однотипный характер.

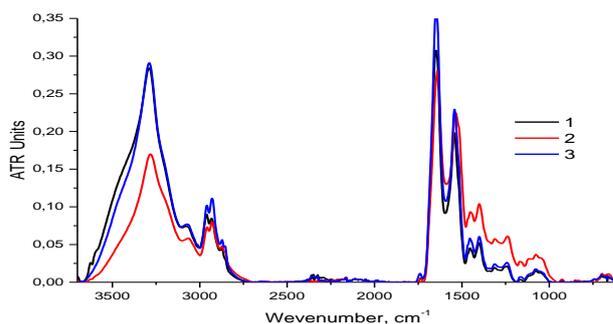


Рис. 1. ИК-спектры сухих препаратов альбуминов животного происхождения:

1 – человеческий; 2 – бычий; 3 – конский

Fig. 1. IR spectra of dry preparations of animal albumins:

1 – human; 2 – bovine; 3 – horse

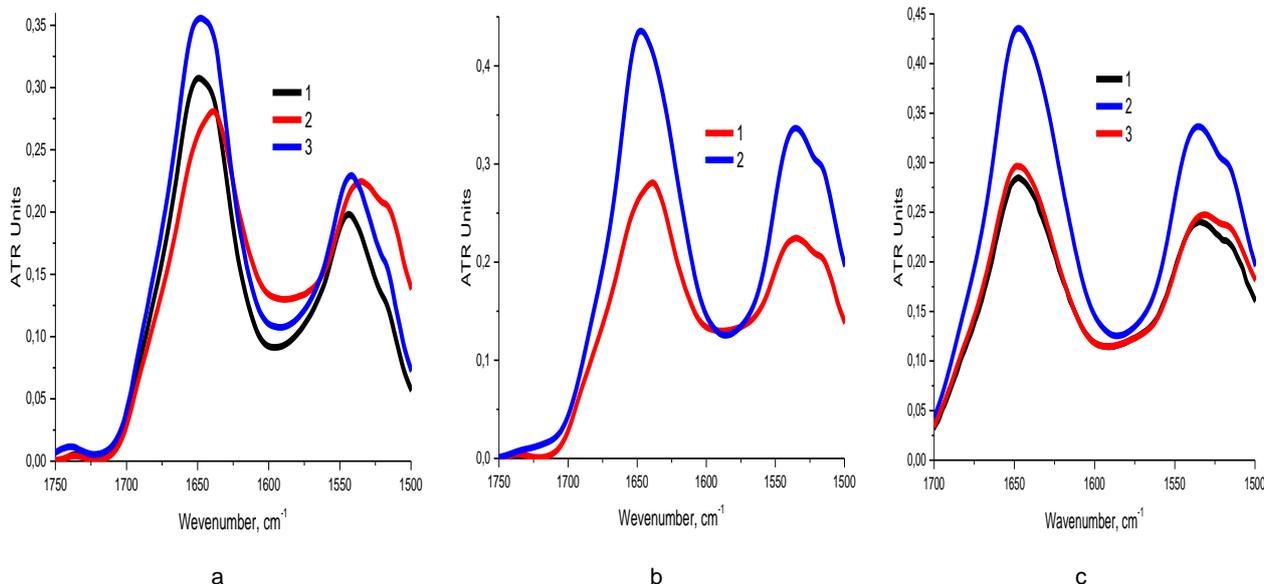


Рис. 2. Фрагменты ИК-спектров (1750–1500 см⁻¹): а – альбуминов животного происхождения; б – бычьей сыворотки (1) и альбумина (2); с – бычьей сыворотки: 1 – раствор, 2 – лиофилизованная, 3 – раствор 1 после замораживания; растворы 1 и 3, высушенные при 20 °С

Fig. 2. Fragments of IR spectra (1750–1500 cm⁻¹): а) animal albumins: 1 – human, 2 – bovine, 3 – horse; б) bovine serum (1) and albumin (2); с) bovine serum: 1 – lyophilized drug, 2 – solution of the drug, 3 – solution after freezing (6 months), dried at 20 °С

Однако фрагменты спектров протеиновой области говорят о заметной разнице в их составе и структуре в зависимости от природы животного организма, что проявляется в форме и смещении максимумов полос Амид-I и Амид-II (рис. 2, а). Анализ фрагментов ИК-спектров лиофилизированных образцов бычьей сыворотки крови, содержащей смесь глобулярных белков (альбуминов и глобулинов) и бычьего альбумина (рис. 2, б), позволяет отметить, что о присутствии в сыворотке крови гетерогенной фракции глобулинов, обладающих более высокой молекулярной массой (15000–500000 Да) [25], может говорить низкочастотный сдвиг максимума асимметричной полосы Амид-I (1640 см^{-1}) по отношению к положению максимума в спектре более низкомолекулярного (1500–70000 Да) альбумина (1655 см^{-1}).

Рис. 2, с иллюстрирует влияние на спектр лиофилизованной бычьей сыворотки (кривая 2) процесса ее растворения (кривая 1) и замораживания раствора при -18 °C в течение 6 мес. (кривая 3). Оба раствора сыворотки подвергались сушке при 20 °C . Максимумы первых полос в спектрах высушенных растворов несколько смещены в высокочастотную область по сравнению со спектром исходного препарата. Процесс замораживания раствора вызывает небольшой батохромный сдвиг второй полосы и ее уширение. Отмеченные нюансы послужили основанием для проведения исследования нативных белков мышечной ткани в условиях воздушной сушки при 20 °C .

Белки мышечной ткани свинины. Для выделения протеинов разной категории из животных тканей, используя различие в их растворимости, чаще всего применяют водную и водно-солевую экстракцию. На рис. 3 приведены спектры водного экстракта мышечной ткани свинины (выделение саркоплазматических белков – альбуминов и глобулинов) и солевого экстракта мышечного волокна (выделение миофибриллярных белков – актина и миозина), высушенных при 20 °C . Их сопоставление показывает, что в солевом экстракте содержится существенно больше белковых компонентов, чем в водном. Это видно из соотношения интенсивности полос Амид-I (1680 см^{-1}) и Амид-II (1540 см^{-1}).

Присутствие интенсивной структурированной полосы в области 1030 см^{-1} в спектре водного экстракта указывает на значительное содержание в нем мукополисахаридов, практически отсутствующих в спектре солевого экстракта. Кроме того, спектр водного экстракта отличается и заметным содержанием липидных компонентов, на которые указывает полоса 1748 см^{-1} валентных колебаний С=О-групп жирных кислот в их составе. А наличие небольшого пика при 3008 см^{-1} , характерного для валентных колебаний СН-групп при двойной связи (СН=СН), гово-

рит о том, что в составе липидных компонентов имеются ненасыщенные жирные кислоты. Интенсивные полосы в области $2953\text{--}2823\text{ см}^{-1}$ обязаны проявлению валентных асимметричных и симметричных колебаний СН_n-групп преимущественно липидных и полисахаридных структурных элементов. Высокочастотные полосы ($3500\text{--}3050\text{ см}^{-1}$) с максимумом, отвечающим колебаниям NH-групп пептидной связи, значительно уширены за счет прочно связанной, преимущественно с белками, воды, не полностью удаляемой в условиях воздушной сушки образцов.

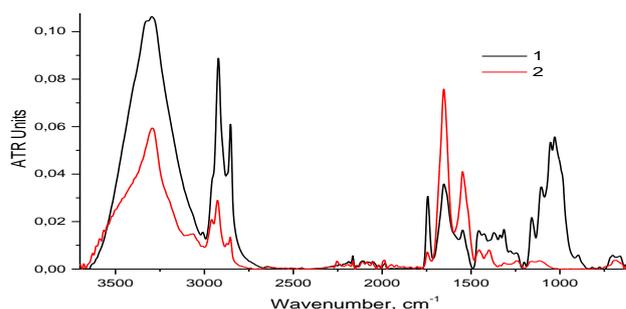


Рис. 3. ИК-спектры водного (1) экстракта мышечной ткани и солевого (2) экстракта мышечного волокна свинины, высушенных при 20 °C

Fig. 3. IR spectra of aqueous (1) muscle tissue extract and salt (2) pork muscle fiber extract dried at 20 °C

Для обратимого осаждения белков из жидких биологических тканей и экстрактов часто используют водоотнимающие средства (этанол, ацетон и др.). Понижая степень гидратации без изменения заряда белков, они способствуют их агрегации и осаждению. В результате обратимости процесса осаждения белки снова могут быть переведены в исходное состояние растворением их осадков в воде. Специфическим реагентом на белки является трихлоруксусная кислота (ТХУК). Нейтрализуя заряд и тем самым способствуя дегидратации, ТХУК необратимо осаждаёт белки и не затрагивает, оставляя в растворе, продукты их деструкции – полипептиды.

ИК-спектры саркоплазматических белков, осажденных из водного экстракта мышечной ткани 96%-м этанолом и 5%-м раствором трихлоруксусной кислоты, показали заметное различие в спектральных характеристиках осадков белков, полученных двумя разными по механизму действия осадителями и высушенных при 20 °C (рис. 4). Близкие по содержанию белковых компонентов, они отличаются по форме полосы Амид-I. В образце, полученном осаждением этанолом, существенно больше липидных компонентов, о чем говорят полосы 1748 , 3008 и сложная полоса в виде трезубца с максимумом при 1160 см^{-1} , характеризующая колебания С-О-групп жирных кислот липидных компонентов. В спектрах обоих образцов практически отсутствуют полисахариды.

На рис. 5, а представлены фрагменты спектров протеиновой области водного и солевого экстрактов из мышечной ткани и мышечного волокна свинины, высушенных при 20 °С (см. рис. 3). Спектр водного экстракта, лежащий существенно ниже, имеет деформированную первую полосу в отличие от ее симметричного контура в спектре солевого экстракта (1652 см⁻¹). Фрагменты спектров пула саркоплазматических белков, представленных на рис. 5, б, позволяют отметить их различие в зависимости от природы осадителя. Полоса Амид-I в спектре образца, полученного осаждением этанолом, многократно структурирована, но положение максимума (1652 см⁻¹) указывает на преобладание в нем глобулинов. Более четкое спектральное разделение альбуминов (1650 см⁻¹) и глобулинов (1620 см⁻¹) позволяет наблюдать их осаждение ТХУК, что отвечает дифференциации двух максимумов в составе полосы Амид-I.

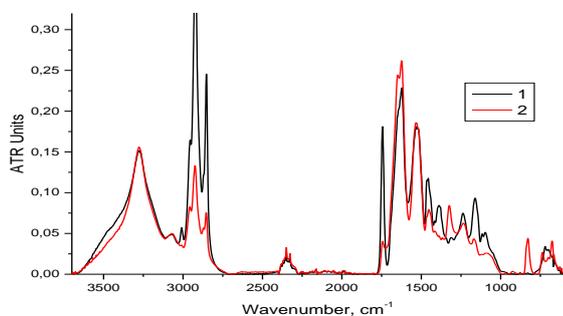


Рис. 4. ИК-спектры саркоплазматических белков, выделенных из водного экстракта этанолом (1) и ТХУК (2)

Fig. 4. IR spectra of sarcoplasmic proteins isolated from an aqueous extract with ethanol (1) and trichloroacetic acid (2)

ИК-спектры саркоплазматических и миофибриллярных белков, выделенных из водного и солевого экстрактов осаждением этанолом, а

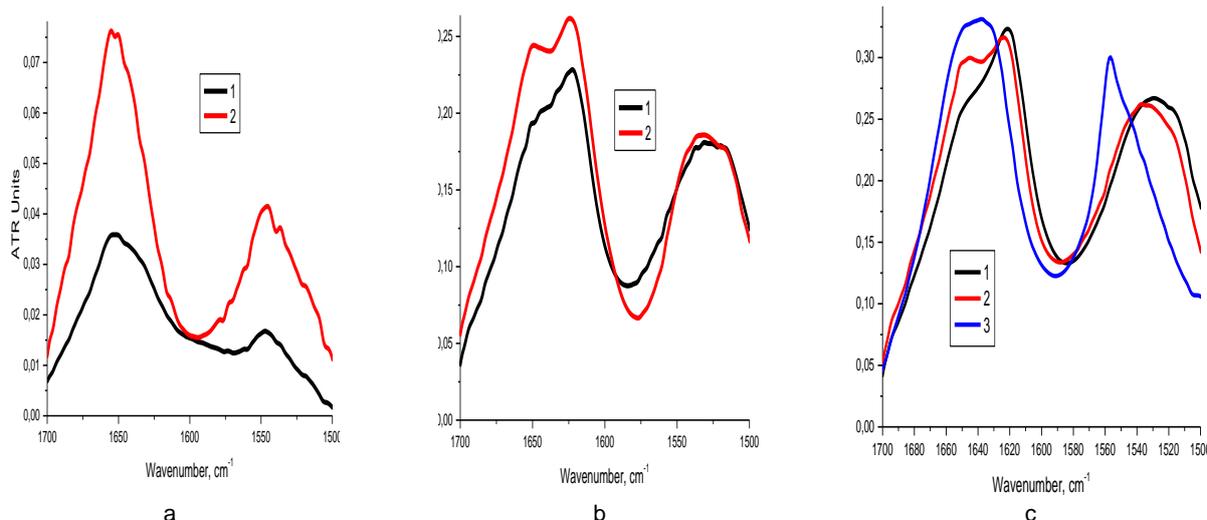


Рис. 5. Фрагменты ИК-спектров (1750–1500 см⁻¹): а – водного (1) и солевого (2) экстрактов; б – саркоплазматических белков, осажденных: 1 – этанолом; 2 – ТХУК; с – белков: 1 – саркоплазматических; 2 – миофибриллярных; 3 – стромы

Fig. 5. Fragments of IR spectra (1750–1500 cm⁻¹): а – water (1) and salt (2) extracts; б – sarcoplasmic proteins precipitated by: 1 – ethanol; 2 – trichloroacetic acid; с – proteins: 1 – sarcoplasmic; 2 – myofibrillar; 3 – stroma

также белков стромы, полученных последовательной экстракцией из мышечного волокна углеводной составляющей стромы и высушенных при 20 °С, иллюстрирует рис. 5, с. В спектре миофибриллярных белков актомиозинового комплекса (кривая 2) также наблюдается четкая структуризация полосы Амид-I с разделением максимума на две составляющие. Полоса 1623 см⁻¹ принадлежит фибриллярному белку миозину, являющемуся основным белком мышечной ткани всех млекопитающих, птиц и рыб (40–60% от общего количества мышечных белков), с очень большим, примерно 1,5 млн, молекулярным весом. Полоса 1650 см⁻¹ обусловлена актином, вторым важным белком сократительного комплекса. Актин может существовать в двух формах – глобулярной мономерной (G-актин) и фибриллярной. (F-актин), которая формируется при полимеризации G-актина в покоящейся мышце. При мышечном сокращении он переходит в глобулярную. Молекулярный вес актина около 75 000 Да. В мышечной ткани его содержится 12–15% [26]. При обработке мышечной ткани солевыми растворами в экстракт переходит актомиозин с неопределенным содержанием актина, которое зависит от длительности извлечения сократительных белков.

Совершенно необычным выглядит спектр белков стромы (кривая 3). Следует отметить, что положение острого асимметричного максимума второй полосы (1563 см⁻¹) в спектре белков стромы стабильно независимо от разного рода обработок. Его интенсивность может меняться в зависимости от интенсивности первой полосы. Соотношение их интенсивности во многом зависит от вида, качества и анатомической части исходного мышечного сырья.

Поскольку в растительных тканях преобладают водорастворимые белки, преимущественно альбумины и глобулины, для сравнения с ними подходят саркоплазматические белки мышечной ткани животных. В связи с этим в данной работе исследовалось влияние на ИК-спектр протеин-содержащих продуктов переработки семян льна условий их экстракции из разных форм сырьевого материала и выделения осаждением, а также температурных условий сушки.

Белки и протеин-полисахаридные комплексы семян льна. Основная масса водорастворимых белков (альбумины, глобулины, глютенины), находится в ядре и экстрагируются из измельченных семян вместе с полисахаридами. Однако процесс выхода слизи в водный раствор из цельных семян неизбежно сопровождается экстракцией водорастворимых протеиновых фракций, находящихся в оболочке и эндосперме семян льна. На рис. 6 приведены спектры образцов протеин-полисахаридных комплексов, полученных водной экстракцией при pH = 6,0 из цельных и измельченных семян льна промышленного, осажденных этанолом и высушенных в термостате при 40–45 °С.

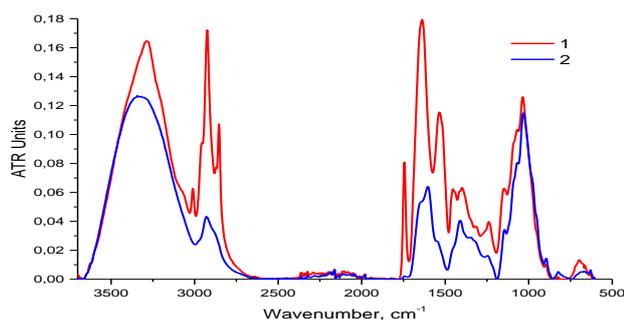


Рис. 6. ИК-спектры сухих образцов полисахаридных комплексов, полученных из измельченных (1) и цельных (2) семян промышленного льна

Fig. 6. IR spectra of dry samples of polysaccharide complexes obtained from grinded (1) and whole (2) seeds of flax industrial

Сопоставление спектральных кривых показывает существенную разницу в оптических свойствах образцов: спектр образца, полученного из измельченных семян, расположен существенно выше и заметно отличается по форме. В нем протеины представлены двумя полосами – Амид-I (1680 см⁻¹) и Амид-II (1540 см⁻¹), типичными для белковых структур как растительного, так и животного происхождения. В то время в спектре полисахаридного комплекса, выделенного из цельных семян, присутствует одна структурированная полоса (1605 см⁻¹), характерная для полипептидных компонентов в составе полисахаридной матрицы. Наличие узкой полосы при 1743 см⁻¹, где регистрируются С=О-группы жирных карбоновых кислот, говорит о том, что в белок-полисахаридных комплексах, полученных из

измельченных семян, содержится значительное количество липидных компонентов, а присутствие полос в областях 3008 и 722 см⁻¹, характеризующих соответственно валентные и деформационные колебания СН-групп при двойной связи (СН=СН), указывает на заметное содержание в их составе ненасыщенных жирных кислот.

Спектральные кривые, представленные на рис. 7, позволяют сопоставить оптические свойства сухих образцов белковых концентратов, полученных из промышленного жмыха (после отделения масла холодным прессованием), в зависимости от способа его обработки перед водно-солевой экстракцией при pH = 6 и условий сушки после ИЭТ-осаждения при pH = 4,2. Образцы белковых концентратов получали из жмыха, предварительно обезжиренного гексаном (№ 1 – 55,80% белка) и прошедшего процедуры удаления слизи водной экстракцией и обезжиривания (№ 2 – 61,50% белка). После ИЭТ-осаждения образцы сушили при 40–45 °С в термостате.

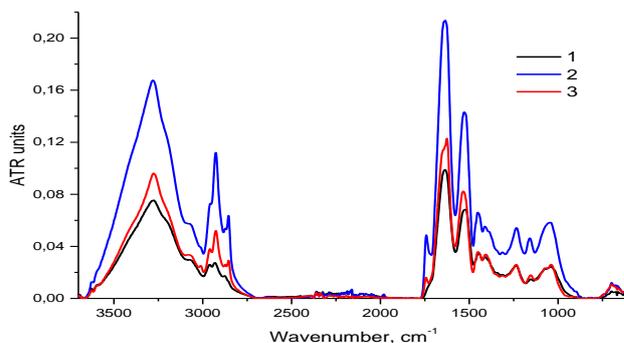


Рис. 7. ИК-спектры образцов белковых концентратов из промышленного жмыха семян льна

Fig. 7. IR spectra of protein concentrates from industrial flax seed cake

Сопоставление спектров 1 и 2 показывает, что введение стадии удаления слизи водной экстракцией жмыха приводит к заметному росту выхода белкового продукта, что следует и из более высокой интенсивности полос Амид-I и Амид-II при близости общего характера кривых светопоглощения (см. рис. 7). Образец № 3 получен прямой солевой экстракцией без всякой предварительной обработки жмыха и после ИЭТ-осаждения проходил воздушную сушку при 20 °С на предметном столике прибора для исключения влияния температурного фактора. Его спектр существенно ближе к спектру образца № 1, а наиболее важным отличием от образцов № 1 и № 2 является структурированная форма полосы Амид-I.

Сопоставление оптических характеристик саркоплазматических белков мышечной ткани, полученных осаждением этанолом, и белков, выделенных ИЭТ-осаждением из жмыха семян льна (образец № 3) и прошедших воздушную сушку при 20 °С, показывает аналогию, но лишь

в общем характере спектров (рис. 8). В обоих образцах присутствуют примеси липидных и полисахаридных компонентов.

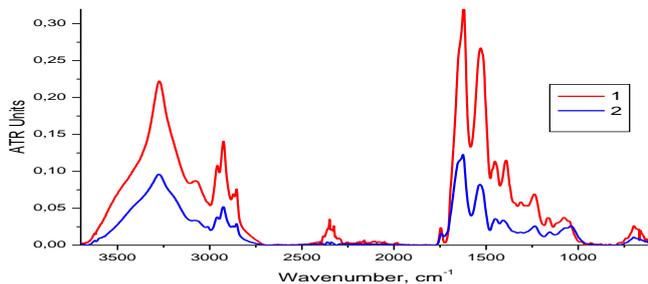


Рис. 8. ИК-спектры водорастворимых белков: 1 – саркоплазмы мышечной ткани; 2 – жмыха семян льна, высушенных при 20 °С (образец № 3)

Fig. 8. IR spectra of water-soluble proteins: 1 – sarcoplasm of muscle tissue; 2 – cake of flax seed (no. 3), dried at 20 °C

Фрагменты спектров в области 1750–1500 см⁻¹ (рис. 9) позволяют сопоставить и проанализировать влияние температуры сушки, анатомической части и природы исходного сырья на спектральные характеристики растительных и животных протеинов. Рис. 9, а иллюстрирует фрагменты ИК-спектров пептид-полисахаридных продуктов водной экстракции из обрушенной оболочки и цельных семян, осажденных этанолом и высушенных при 40–45 °С. В обоих случаях в протеиновой области отмечаются одиночные полосы, отличающиеся по интенсивности и форме, с повышенным содержанием протеинов в образце, полученном из измельченной семенной оболочки. Для образца протеин-полисахаридного комплекса, полученного из цельных семян, характерно более высокое содержание липидов (1748 см⁻¹). Обраща-

ет на себя внимание то, что классический дублет белковых полос Амид-I и Амид-II (рис. 9, б), присутствующий только в спектрах белковых концентратов, выделенных из жмыха (№ 1 и № 2) и белок-полисахаридного комплекса (см. рис. 6, кривая 1), высушенных при 40–45 °С, независимо от способа осаждения, наблюдается в спектрах всех лиофилизированных белоксодержащих биологических материалах, в том числе альбуминов животного происхождения и сыворотки крови животных (см. рис. 1 и 2). Спектр образца белкового концентрата № 3, прошедший воздушную сушку при 20 °С, имеет структурированную полосу Амид-I (рис. 9, б, кривая 3).

Влияние температурного фактора на спектр при сушке белковых компонентов как растительного, так и животного происхождения подтверждают кривые светопоглощения белков семян льна и саркоплазматических белков мышечной ткани свиньи (рис. 9, с), высушенных при 20 °С. В обоих случаях первая амидная полоса, несущая структурную информацию о белке, деформирована. Вклад в деформацию в определенной степени может вносить не только возможность дифференциации глобулярных белков (альбуминов и глобулинов), но и упаковка их полипептидных цепей при реконструкции или формировании новой вторичной структуры, разрушенной в результате различных механических и химических вмешательств. Комплекс полученных данных указывает на то, что повышенная температура оказывает существенное влияние на структурно-конформационные преобразования как белковых концентратов, так и белок-полисахаридных комплексов независимо от их природы.

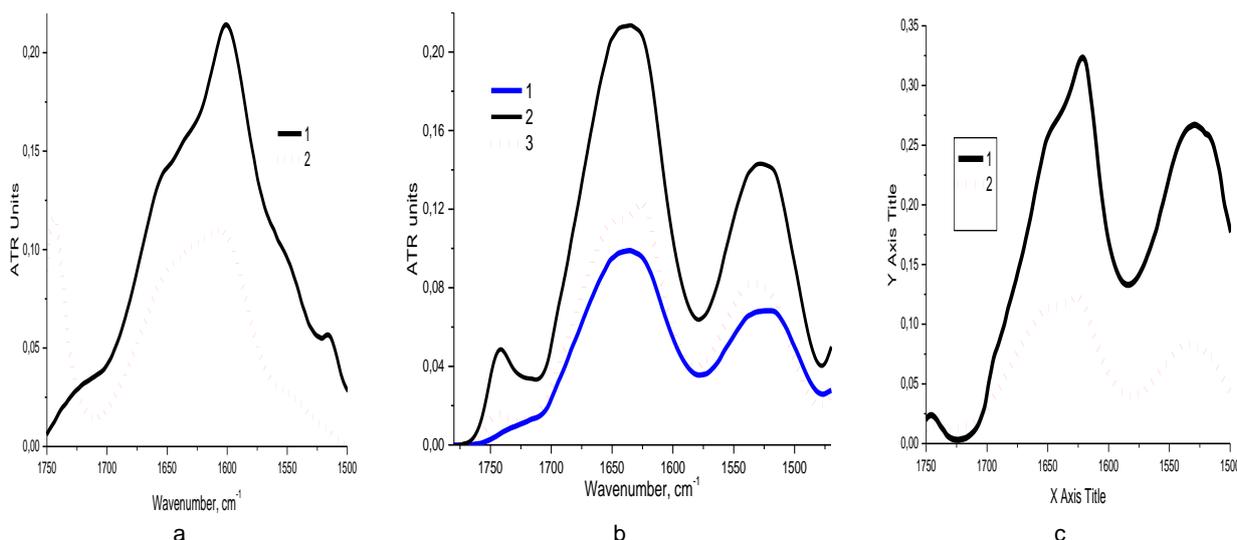


Рис. 9. Фрагменты ИК-спектров (1750–1500 см⁻¹): а – пептид-полисахаридных комплексов из: 1 – измельченной семенной оболочки, 2 – цельных семян льна; б – белковых концентратов: 1 – № 1; 2 – № 2; 3 – № 3; с – саркоплазматических белков мышечной ткани (1), белкового концентрата льна (2)

Fig. 9. Fragments of IR spectra (1750–1500 cm⁻¹): а – peptide-polysaccharide complexes from: 1 – crushed seed coat, 2 – whole flax seeds; б – protein concentrates: 1 – no. 1; 2 – no. 2; 3 – no. 3; с – sarcoplasmic proteins of muscle tissue (1), flax protein concentrate (2)

С целью оценки возможности контроля за характером изменений спектральных характеристик протеиновых структур по мере удаления воды в процессе естественной сушки ИК-спектры влажного белкового концентрата № 3 снимали в течение 25 мин через определенные промежутки времени при 20 °С. Увеличенные фрагменты протеиновой области спектров иллюстрируют кинетику изменения его спектрального образа на разных этапах сушки (рис. 10, а). Именно на этих фрагментах в процессе естественного удаления воды отчетливо проявлены неоднозначность и скачкообразный характер изменений спектральных характеристик образца. Анализируя форму полос, их структуру, интенсивность, положение и сдвиги максимумов в области 1750–1500 см⁻¹ можно отметить, что в первых двух спектрах, полученных в течение первых 4-х мин, присутствует только одна полоса деформационных колебаний ОН-групп молекул воды – 1643 см⁻¹, совпадающая с первой протеиновой полосой. В спектре 3 в области 1540 см⁻¹ начинает проявляться вторая полоса протеинов; к 11 мин сушки (спектр 4) обе полосы увеличиваются по интенсивности, при этом первая полоса смещается bathохромно в положение 1635 см⁻¹.

В спектре 5 (13 мин) интенсивность обеих

полос резко возрастает, но у первой полосы максимум регистрируется уже в положении 1620 см⁻¹. Максимальной интенсивности обе полосы достигают в спектре 6 (к 15 мин); при этом наблюдается структуризация первой – на ее левой ветви в области 1657 см⁻¹ появляется плечо, второй максимум смещается в низкочастотную область (1536 см⁻¹). С этого момента обе протеиновые полосы, сохраняя структуру и положение максимумов, резко снижаются по интенсивности, стабилизируясь к 23–25 мин. Спектры 10 и 11 отвечают хрупкой пленке сухого белкового концентрата.

Рис. 10, б иллюстрирует кинетику изменения интенсивности основных полос в процессе воздушной сушки образца белкового концентрата № 3. После достижения максимума к 15 мин сушки интенсивность всех полос резко падает, но при этом продолжает снижаться и интенсивность полосы NH-групп (3250 см⁻¹). Все полосы стабилизируются по положению максимумов и поглощению к 23–25 мин сушки. Резкий перелом на кривых к 15 мин может говорить о внутри- и межмолекулярном взаимодействиях С=О, NH- и СН-групп, интенсифицирующих процесс удаления остаточной воды с образованием компактной, но хрупкой пленки.

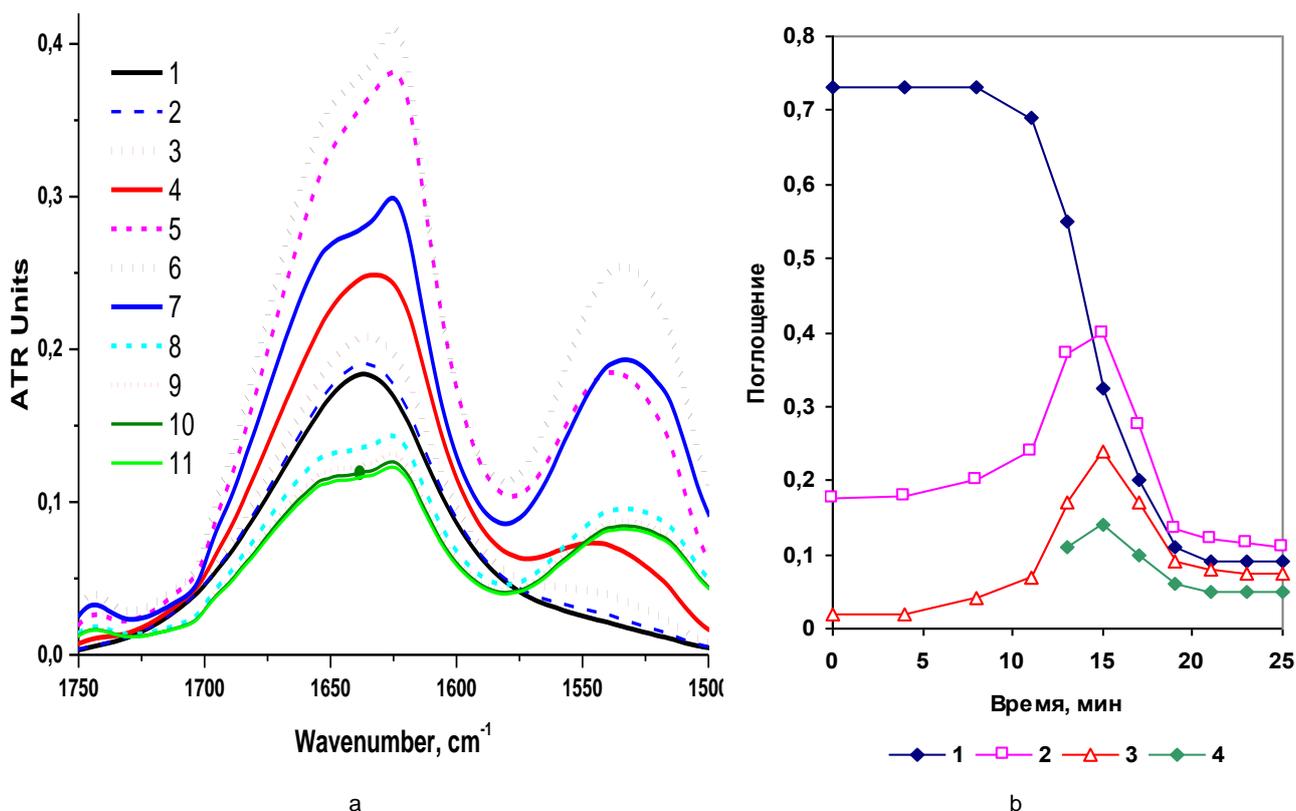


Рис. 10. Изменение интенсивности основных полос в ИК-спектрах образца № 3 в процессе сушки: а – протеиновая область (1750–1500см⁻¹): 1 – 0; 2 – 4; 3 – 8; 4 – 11; 5 – 13; 6 – 15; 7 – 17; 8 – 19; 9 – 21; 10 – 23; 11 – 25 мин; б – полосы: 1 – 3250; 2 – 1620; 3 – 1540; 4 – 2927 см⁻¹

Fig. 10. a – change in IR spectra (1750–1500 cm⁻¹): 1 – 0; 2 – 4; 3 – 8; 4 – 11; 5 – 13; 6 – 15; 7 – 17; 8 – 19; 9 – 21; 10 – 23; 11 – 25 min; b – change in the intensity of the main bands: 1 – 3250; 2 – 1620; 3 – 1540; 4 – 2927 cm⁻¹ in the process of sample no. 3 drying

Характер изменения протеиновой области спектра пептид-полисахаридного комплекса (рис. 11, а), выделенного из обрушенной оболочки семян льна, совсем не похож на тот, что наблюдался при сушке белкового концентрата (см. рис. 10, а). По мере ухода воды (кривые 1 и 2 – полоса деформационных колебаний ее ОН-групп) весь спектр поднимается (кривая 3) с формированием новых полос в области 1593, 1542 и 1515 cm^{-1} . Дальнейшая сушка приводит к существенному изменению общего вида спектра. Снижается интенсивность полосы 1638 cm^{-1} и резко возрастает полоса 1593 cm^{-1} . Общий вид кривых 8 и 9 и кинетика изменения спектральных

характеристик близки по характеру к данным по пептид-полисахаридному комплексу, полученному из цельных семян льна (см. рис. 9, а).

Интересные результаты показало графическое представление кинетики изменения характера спектральных кривых при воздушной сушке саркоплазматических белков мышечной ткани свинины (рис. 11, б), в которых оказалось много общего с данными, полученными для белкового концентрата из семян льна (см. рис. 10, а), в том числе и по преобладанию в них глобулиновой фракции. Кроме того, отмечено, что в процессе воздушной сушки альбумины теряют связанную воду быстрее, чем глобулины.

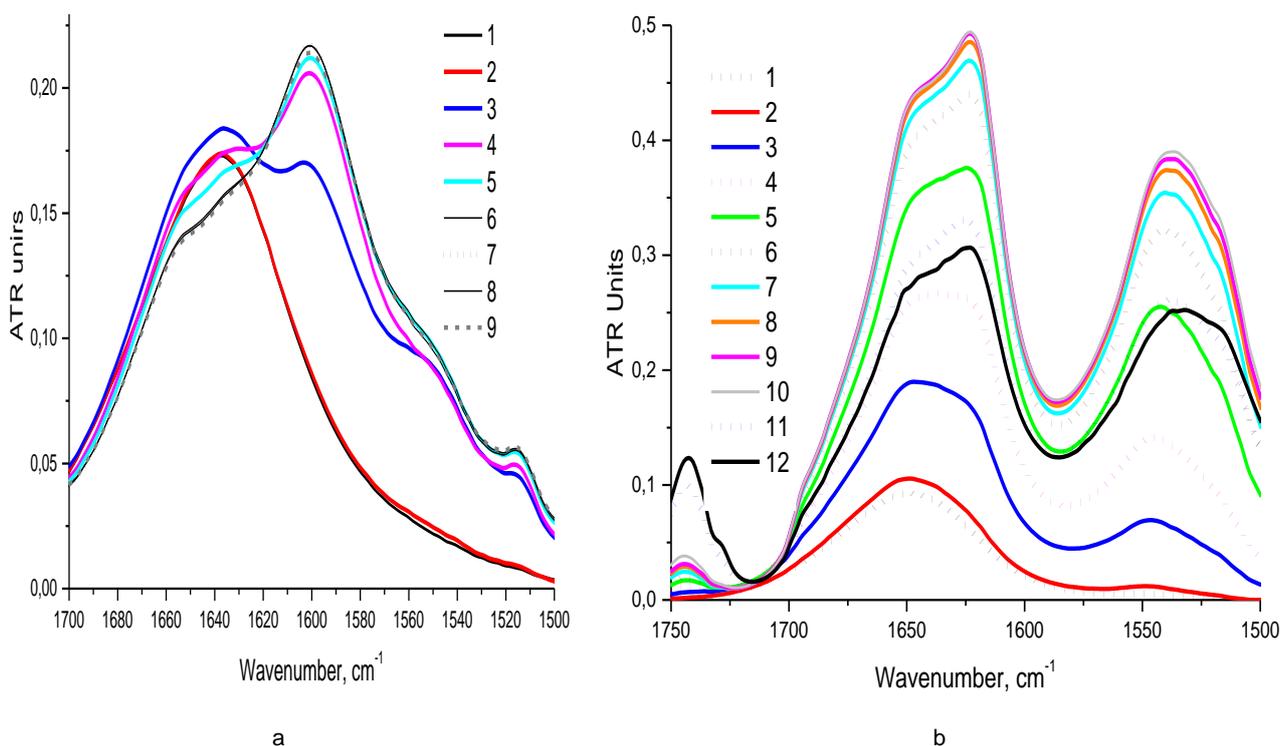


Рис. 11. Изменение ИК-спектров протеиновой области ($1750\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) при сушке ($20\text{ }^\circ\text{C}$) сырых образцов:
а – пептид-полисахаридного комплекса из оболочки семян льна;
б – саркоплазматических белков мышечной ткани свинины

Fig. 11. Change in the IR spectra ($1750\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) during raw samples drying ($20\text{ }^\circ\text{C}$):
а – peptide-polysaccharide complex of flax seeds;
б – sarcoplasmic proteins of pork muscle tissue

ВЫВОДЫ

Варьирование анатомической части семян льна (обрушенные ядро и семенная оболочка) и их сырьевой формы (цельное, измельченное, жмых), а также условий экстрагирования и выделения целевых протеинсодержащих продуктов позволяет получать их расширенный ассортимент – белковые концентраты, белок-полисахаридные и белок-липид-полисахаридные комплексы, пептид-полисахариды с переменным соотношением компонентов, которые могут быть использованы в пищевой, косметической промышленности, медицинской и фармацевтической практике.

Сравнительное исследование методом ИКс НПВО глобулярных белков саркоплазмы мышечной ткани свинины и семян льна масличного, извлеченных из сырья водно-солевой экстракцией и выделенных осаждением этанолом, ТХУК и ИЭТ-осаждением, показало много общего в кинетике изменений рисунка спектральных кривых сырых растительных и животных образцов, сушившихся при $20\text{ }^\circ\text{C}$. Экстремальный характер изменения интенсивности основных полос в обоих случаях обусловлен началом активного образования межмолекулярных связей CO и NH групп пептидных цепей по мере удаления из системы связанных молекул воды.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кауль А.К., Джесвани Л.М., Денди Д.А.В. и др. Источники пищевого белка. М.: Колос, 1979. 302 с.
2. Толстогузов В.Б. Новые формы белковой пищи. М.: Агропромиздат, 1987. 303 с.
3. Рудинцева Т.А., Сафронова Г.А., Нечаева Н.Г. Лечебно-профилактические мясные продукты // Мясная промышленность. 1994. N 6. С. 26–27.
4. Хлебников В.И., Дмитриенко С.Ю. Качество мясных изделий, обладающих функциональными свойствами // Пищевая технология. 2004. N 1 (2780). С. 67–68.
5. Самченко О.Н. Использование мяса диких животных в технологии мясных изделий // Наука и современность. 2013. N 24. С. 220–224.
6. Берлова Г.А. Мясо диких животных. Особые правила, особые рецепты // Всё о мясе. 2008. N 6. С. 58–59.
7. Герасимова Н.Ю. Нетрадиционные виды мясного сырья для производства функциональных продуктов // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2012. N 2-3 (326-327). С. 17–20.
8. Таева А.М. Микроструктурные исследования мяса казахского двугорбого верблюда // Мясная индустрия. 2016. N 8. С. 46–49.
9. Нестеренко А.А., Патиева А.М., Ильина Н.М. Инновационные технологии в производстве колбасной продукции: монография. Саарбрюккен: Palnarium Academic Publishing, 2014. 165 с.
10. Щербакова Е.В. Применение биотехнологических методов при переработке растительного масличного сырья. Краснодар: Ризограф, 2006. 288 с.
11. Овчаров С.И. Совершенствование технологии получения белковых изолятов из подсолнечного жмыха // Молодой ученый. 2015. N 12 (92). С. 267–270.
12. Усатюк С.И., Савчук Ю.Ю. Исследование процесса экстрагирования белка из грецкого ореха // Вестник Алматинского технологического университета. 2015. N 2. С. 22–26.
13. Комов В.П., Шведова В.Н. Биохимия. М.: Дрофа, 2004. 618 с.
14. Воронова Н.С., Бердина Л.С. Исследование белков семян льна как полноценных и необходимых для здоровья человека // Молодой ученый. 2015. N 14 (94). С. 144–147.
15. Цыганова Т.Б., Миневич И.Э., Зубцов В.А., Осипова Л.Л. Пищевая ценность семян льна и перспективные направления их переработки. Калуга: Эйдос, 2010. 124 с.
16. Миневич И.Э., Осипова Л.Л., Ущатовский И.В., Абрамов Д.В., Краюшкина В.Н. Технология получения белковых концентратов из льняного жмыха для использования в промышленном производстве // Хлебопродукты. 2019. N 8. С. 34–37. <https://doi.org/10.32462/0235-2508-2019-30-8-34-37>
17. Скоупс Р.К. Методы очистки белков / пер. с англ. В.К. Антонова. М.: Мир. 1985. 358 с.
18. Nadathur S.R., Wanasundara J.P.D., Scanlin L. Sustainable protein sources. Academic Press, 2017. 456 p.
19. Stuart B.H. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. N.-Y.: Wiley, 2004. 242 p.
20. Сильверстейн Р., Вебстер Ф., Кимл Д. Спектрометрическая идентификация органических соединений / пер. с англ. Н.М. Сергеева, Б.Н. Тарасевича. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 557 с.
21. Krimm S., Bandekar J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins // Advances in Protein Chemistry. 1986. Vol. 38. P. 181–364.
22. Рогов И.А., Забашта А.Г., Казюлин Г.П. Общая технология мяса и мясопродуктов. М.: Колос. 2000. 367 с.
23. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных лекарственных препаратов // Российский биотерапевтический журнал. 2017. Т. 16. N 1. С. 6–11. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2017-16-1-6-11>
24. Игнатов В.Е., Пойманов В.В., Нестеров Д.А. Исследование процесса вакуум-сублимационной сушки бактериальных концентратов // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2013. N 1. С. 27–29. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2013-1-27-29>
25. Busher J.T. Serum Albumin and Globulin. In: Walker Y.K., Hall W.D., Hurst J.W. (ed.). Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition. Boston: Butterworths, 1990. Chapter 101. P. 497–499.
26. Кубасова Н.А., Цатурян А.К. Молекулярный механизм работы актин-миозинового мотора в мышце // Успехи биологической химии. 2011. Т. 51. С. 233–282.

REFERENCES

1. Caule AK, Jeswani LM, Dendi DAV, et al. *Food protein sources*. Moscow: Kolos; 1979. 302 p. (In Russian)
2. Tolstoguzov VB. *New forms of protein food*. Moscow: Agropromizdat, 1987. 303 p. (In Russian)
3. Rodintseva TA, Safronova GA, Nechaeva NG. Medioprophyllactic meat products. *Myasnaya promyshlennost'*. 1994;6:26–27. (In Russian)
4. Khlebnikov VI, Dmitrienko SYu. Quality of meat products with functional properties. *Pishchevaya tekhnologiya = Food technology*. 2004;1:67–68. (In Russian)
5. Samchenko ON. Use of meat of wild animals in meat products technology. *Nauka i sovremen-*

nost'. 2013;24:220–225. (In Russian)

6. Berlova GA. Meat of wild animals. Special rules, special recipes. *Vse o myase*. 2008;6:58-62. (In Russian)

7. Gerasimova NYu. Non-traditional meat raw material for functional products manufacture. *News of Institutes of Higher Education. Food technology*. 2012;2-3:17–20. (In Russian)

8. Taeva AM. Microstructural investigations of meat from kazakh bactrian camel. *Myasnaya industriya*. 2016;8;46–49. (In Russian)

9. Nesterenko AA, Patieva AM, Il'ina NM. *Innovative technologies in sausage products production*. Saarbrücken: Pahnarium Academic Publishing; 2014. 165 p. (In Russian)

10. Shcherbakova EV. *Application of biotechnological methods in the processing of vegetable oilseeds*. Krasnodar: Rizograf; 2006; 288 p. (In Russian)

11. Ovcharov SI. Improvement of the technology for obtaining protein isolates from sunflower cake. *Molodoi uchenyi*. 2015;12;267–270. (In Russian)

12. Usatyuk SI, Savchuk YY. Investigation of protein extraction out of walnut. *Vestnik Almatinskogo tekhnologicheskogo universiteta = The Journal of Almaty Technological University*. 2015;2:22–26. (In Russian)

13. Komov VP, Shvedova VN. *Biochemistry*. Moscow: Drofa; 2004. 618 p. (In Russian)

14. Voronova NS, Berdina LS. Research of flax seed proteins as full-fledged and necessary for human health. *Molodoi uchenyi*. 2015;14;144–147. (In Russian)

15. Tsyganova TB, Minevich IE, Zubtsov VA, Osipova LL. *Nutritional value of flax seeds and promising directions of their processing*. Kaluga: Eidos; 2010. 124 p. (In Russian)

16. Minevich IE, Osipova LL, Ushchapovskiy IV, Abramov DV, Krayushkina VN. Technology for obtaining protein concentrates from flax meal to use in industrial production *Khleboпродукты*. 2019;8:34–37. (In Russian) <https://doi.org/10.32462/0235-2508-2019-30-8-34-37>

17. Scopes RK. *Protein purification. Principles*

and Practice. New York: Springer-Verlag; 1982. (Russ. ed.: Skoups RK. *Metody ochistki belkov*. Moscow: Mir; 1985. 358 p.)

18. Nadathur SR, Wanasundara JPD, Scanlin L. *Sustainable protein sources*. Academic Press; 2017. 456 p.

19. Stuart BH. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. New York.: Wiley; 2004. 242 p.

20. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Willey & Sons, 2005. (Russ. ed.: Sil'verstein R, Vebster F, Kiml D. *Spektrometricheskaya identifikatsiya organicheskikh soedinenii*. Moscow: BINOM. Laboratoriya znanii; 2011. 557 p.)

21. Krimm S, Bandekar J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Advances in Protein Chemistry*. 1986;38:181–364.

22. Rogov IA, Zabashta AG, Kazyulin GP. General technology of meat and meat products. Moscow: Kolos; 2000. 367 p. (In Russian)

23. Blynskaya EV, Tishkov SV, Alekseev KV. Technological approaches to improving the process lyophilization of protein and peptide drugs. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2017;16(1):6–11. (In Russian) <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2017-16-1-6-11>

24. Ignatov VE, Poimanov VV, Nesterov DA. Research of bacterial concentrates freeze-drying process. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologii = Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2013;1:27–29. (In Russian) <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2013-1-27-29>

25. Busher JT. Serum Albumin and Globulin. In: Walker YK, Hall WD, Hurst JW. (eds.) *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd ed. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 101. p. 497–499.

26. Kubasova NA, Tsaturyan AK. Molecular mechanism of actin-myosin motor in muscle. *Uspekhi biologicheskoi khimii*. 2011;51:233–282. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Нечипоренко Алла Павловна,

д.х.н., профессор,
Национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики,
197101, г. Санкт-Петербург,
Кронверкский пр-т, 49,
Российская Федерация,
✉ e-mail: allanech2512@yandex.ru

Миневич Ирина Эдуардовна,

к.т.н., ведущий научный сотрудник,
Федеральный научный центр лубяных культур,
170041, г. Тверь, Комсомольский пр-т, 17/56,

AUTHORS' INDEX

Alla P. Nechiporenko,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
National Research University of Information
Technologies, Mechanics and Optics,
49, Kronverkskii Ave., St. Petersburg, 197101,
Russian Federation,
✉ e-mail: allanech2512@ yandex.ru

Irina E. Minevich,

Cand. Sci. (Engineering),
Leading Researcher,
Federal Scientific Center for Fiber Crops,

Российская Федерация,
e-mail: irina_minevich@mail.ru

17/56, Komsomolskii Ave., Tver, 170041,
Russian Federation,
e-mail: irina_minevich@mail.ru

Орехова Светлана Михайловна,
к.т.н., заведующая лабораторией
химико-биологического класса,
Национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики,
197101, г. Санкт-Петербург,
Кронверкский пр-т, 49,
Российская Федерация,
e-mail: sveta.orehova2012@yandex.ru

Svetlana M. Orehova,
Cand. Sci. (Engineering),
Head of the Laboratory of Chemical
and Biological Class,
National research University of Information
Technologies, Mechanics and Optics,
49, Kronverkskii Ave., St. Petersburg, 197101,
Russian Federation,
e-mail: sveta.orehova2012@yandex.ru

Ситникова Вера Евгеньевна,
к.х.н., старший преподаватель,
Национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики,
197101, г. Санкт-Петербург,
Кронверкский пр-т, 49,
Российская Федерация,
e-mail: kresenka@gmail.com

Vera E. Sitnikova,
Cand. Sci. (Chemistry),
Senior Lecturer,
National research University of Information
Technologies, Mechanics and Optics,
49, Kronverkskii Ave., St. Petersburg, 197101,
Russian Federation,
e-mail: kresenka@gmail.com

Громова Диана Александровна,
магистрант,
Национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики,
197101, г. Санкт-Петербург,
Кронверкский пр-т, 49,
Российская Федерация,
e-mail: 16adianay@gmail.com

Diana A. Gromova,
Master Student,
National Research University of Information
Technologies, Mechanics and Optics,
49, Kronverkskii Ave., St. Petersburg, 197101,
Russian Federation,
e-mail: 16adianay@gmail.com

Успенская Майя Валерьевна,
д.т.н., профессор, директор
научно-исследовательского центра
биоинженерии,
Национального исследовательского
университета информационных технологий,
механики и оптики,
197101, г. Санкт-Петербург,
Кронверкский пр-т, 49,
Российская Федерация,
e-mail: mv_uspenskaya@mail.ru

Mayya V. Uspenskaya,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Director of the Research Center
for Bioengineering,
National research University of Information
Technologies, Mechanics and Optics,
49, Kronverkskii Ave., St. Petersburg, 197101,
Russian Federation,
e-mail: mv_uspenskaya@mail.ru

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

*Статья поступила в редакцию 25.03.2020;
одобрена после рецензирования 16.07.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

*The article was submitted 25.03.2020;
approved after reviewing 16.07.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 54.056: 547.814.5

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-691-699>



Некоторые закономерности экстракции антоцианов из растительных источников

© Я.Ю. Саласина, Д.А. Калинин, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека

Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
г. Белгород, Российская Федерация

Резюме: Работа посвящена определению закономерностей экстракции антоцианов из различных растительных источников в некоторых экстрагентах. Для экстракции использовали свежий растительный материал: корнеплоды фиолетовой моркови, корнеплоды фиолетового картофеля сорта Аметист, свежие плоды аронии Мичурина, плоды паслена садового, плоды кизила обыкновенного, чернику и краснокочанную капусту, а также высушенные лепестки пиона. Экстракцию осуществляли настаиванием растительного материала в избранном экстрагенте (оставляли на ночь). Концентрацию антоцианов определяли спектрофотометрическим методом. Показано, что 0,1 М водный раствор HCl является эффективным и экологически безопасным экстрагентом, позволяющим осуществлять экстракцию антоцианов из многих объектов. При значениях кислотности среды больше 1 возможны значительные потери антоцианов: 5–45% – при pH = 2; 33–88% – при pH = 3; 41–92% – при экстракции дистиллированной водой. Ацилирование не способствует росту степени экстрагирования антоцианов. Добавки органических растворителей (этанола, ацетонитрила и глицерина) в ряде случаев позволяют существенно ускорить экстракцию антоцианов, особенно в случае плодов кизила обыкновенного. Влияние экстрагента на степень экстрагирования нивелируется для измельченного материала. Приведены данные по сольватохромному эффекту, влияющему на спектральные характеристики растворов некоторых антоцианов. Показано, что сдвиг максимума полосы поглощения велик в случае неацилированных антоцианов и уменьшается для ацилированных соединений, по всей вероятности, вследствие внутримолекулярной копигментации ацилированных антоцианов в водных растворах. Отмечено, что при определении концентрации антоцианов в растворителях с различной концентрацией органической добавки необходимо учитывать сольватохромный эффект. Показано, что добавка органического растворителя приводит не только к смещению максимумов полос поглощения, но и к значительным гиперхромным эффектам. При игнорировании этого эффекта погрешности в определении антоцианов могут превысить 70%. Предложен простой и эффективный способ учета указанных эффектов по схеме перекрестных разбавлений. Таким образом, экспериментально обоснован выбор экстрагентов для эффективной экстракции антоцианов из некоторых видов растительного сырья и предложен метод оценки сольватохромных эффектов.

Ключевые слова: антоцианы, экстракция, влияние pH, сольватохромные эффекты, способ учета

Для цитирования: Саласина Я.Ю., Калинин Д.А., Дейнека В.И., Дейнека Л.А. Некоторые закономерности экстракции антоцианов из растительных источников. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 4. С. 691–699. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-691-699>

Some regularities in the process of anthocyanin extraction from vegetable sources

Yaroslava Yu. Salasina, Danila S. Kalinikin, Viktor I. Deineka, Lyudmila A. Deineka

Belgorod National Research University,
Belgorod, Russian Federation

Abstract: This work investigates regularities in the process of extracting anthocyanins from various plant sources in the medium of extractants. For extraction, fresh plant samples were used, including the roots of purple carrots, roots of purple potatoes of the Amethyst variety, fresh fruits of Michurin's aronia, fruits of the garden nightshade, comelian cherries, blueberries and red cabbage, as well as dried peony petals. The extraction was carried out by infusing the plant material under study in a selected extractant (left overnight). The concentration of anthocyanins was determined spectrophotometrically. It was shown that a 0.1 M aqueous solution of HCl is an effective and environmentally friendly extractant allowing for the extraction of anthocyanins from various sources. Provided that the medium acidity is greater than 1, significant losses of

anthocyanins are possible: 5–45% at pH = 2; 33–88% at pH = 3; 41–92% when extracted with distilled water. Acylation does not contribute to an increase in the degree of anthocyanin extraction. The addition of organic solvents (ethanol, acetonitrile and glycerin) can significantly accelerate the anthocyanin extraction in some cases, which is particularly true for cornelian cherries. When using crushed material, the influence of the extractant on the degree of extraction is minimal. Information is presented on the solvatochromic effect, which affects the spectral characteristics of some anthocyanin solutions. It was shown that the shift of the absorption band maximum is the greatest for non-acylated anthocyanins, while decreasing for acylated compounds. The latter is most likely to be associated with the intramolecular copigmentation of acylated anthocyanins in aqueous solutions. When determining the concentration of anthocyanins in solvents with different concentrations of organic additives, the solvatochromic effect should be taken into account. The addition of an organic solvent leads not only to a shift in the absorption band maxima, but also to significant hyperchromic effects. If this effect is ignored, errors in determination of anthocyanins can exceed 70%. This paper proposes a simple and effective approach to considering these effects using a cross-dilution scheme. Therefore, the choice of extractants for efficient anthocyanin extraction from various plant raw materials was experimentally substantiated, and a method for evaluating solvatochromic effects was proposed.

Keywords: anthocyanins, extraction, pH influence, solvatochromic effects, accounting method

For citation: Salasina YYu, Kalinikin DA, Deineka VI, Deineka LA. Some regularities in the process of anthocyanin extraction from vegetable sources. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):691–699. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-691-699>

ВВЕДЕНИЕ

Антоцианы как подкласс обширного класса флавоноидов – это вещества, хорошо растворимые в воде, существующие в нескольких pH-зависимых формах, часть которых окрашена [1, 2]. Высокая антиоксидантная активность антоцианов [2, 3] и красящая способность [4] позволяют рассматривать эти соединения как природные антиоксиданты и красители для пищевой и медицинской промышленности. Природные антоцианы являются гликозидами антоцианидинов, синтезируемых в плодах, цветках, листьях и других частях многих растений [5], поэтому для их извлечения из растительных источников на первом этапе необходима экстракция. Существуют различные технологии экстракции антоцианов из растительного сырья, представленные, например, в работах [6–9]. Антоцианы нерастворимы в неполярных органических растворителях, поэтому базовые компоненты экстрагентов – вода, смешивающиеся с водой органические растворители и подкислитель. Подкислитель добавляется для перевода различных форм антоцианов в самую устойчивую флавилиевую форму (I) (рис. 1). В качестве подкислителя можно использовать минеральные кислоты, чаще всего используют соляную кислоту, добавки которой (до pH ≤ 1) обеспечивают условия для существования антоцианов только во флавилиевой форме. При этом подавляется и реакция гидратации антоцианов до не отличающихся устойчивостью бесцветных псевдооснований (II), которые легко превращаются в слабоокрашенные *цис*-халконную (III) и далее – в *транс*-халконную (IV) формы (см. рис. 1).

Одна из важных функций добавок органических растворителей – исключение экстракции полимерных и олигомерных гидрофильных сое-

динений, из-за которых возможны проблемы при хранении и использовании антоцианов. В качестве основных органических растворителей используют этанол и метанол, но известно использование и других растворителей, в том числе ацетона [10], некоторых одноатомных спиртов [11, 12], глицерина [13, 14].

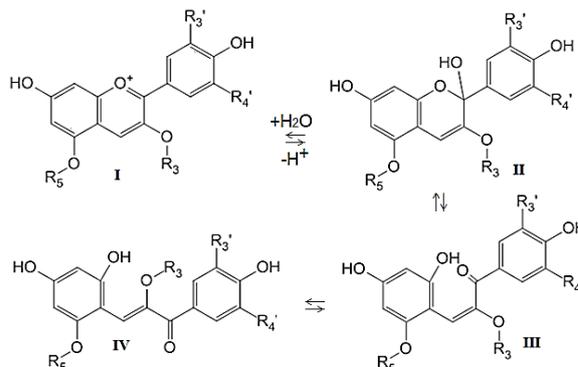


Рис. 1. Схема одного из направлений превращения антоцианов с повышением pH

Fig. 1. One of the directions of anthocyanins conversion with increasing pH

При сравнении экстракционной эффективности органических добавок возникает проблема сопоставления концентрации антоцианов из-за сольватохромного эффекта, приводящего не только к смещению максимумов полос поглощения [15], но и к изменению коэффициентов экстинкции, которые для многих систем не известны. Поэтому нашей целью являлась разработка подхода, позволяющего сопоставлять коэффициенты экстинкции антоцианов в растворителях любых составов и методы экстракции антоцианов, подкисленных водными и водно-органическими смесями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали свежие корнеплоды фиолетовой моркови (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.), свежие корнеплоды картофеля сорта Аметист с фиолетовой мякотью, свежие плоды аронии Мичурина (*Aronia mitchurinii* Skvortsov & Maitul), плоды паслена садового (*Solanum retroflexum* Dunal.), выращенные в г. Белгород, а также плоды кизила обыкновенного (*Cornus mas* L.), черники (*Vaccinium myrtillus* L.) и краснокочанную капусту (*Brassica oleracea* var. *capitata* F. *rubra*), приобретенные на рынке г. Белгорода, и высушенные лепестки пиона.

Для приготовления экстрагентов использовали дистиллированную воду, этанол, ацетонитрил, глицерин, соляную кислоту.

Экстракцию выполняли в статических условиях настаиванием смеси растительного материала и экстрагента в течение 12 ч. Экстракты отделяли от остатка фильтрованием через бумажный фильтр на воронке Бюхнера под вакуумом.

Электронные спектры поглощения записывали в кварцевых кюветах на спектрофотометре Shimadzu UV 2550 при pH = 1 без поправок на абсорбцию «полимерных» антоцианов. При расчетах использовали пересчет на цианидин-3-глюкозид хлорид с $\epsilon = 26900 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [16].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В большинстве опубликованных работ, к сожалению, при сопоставлении экстрагирующей способности различных растворителей используется только однократная экстракция. Но при отсутствии данных по исчерпывающей экстракции невозможно оценить эффективность экстрагентов. В этом отношении важен результат первой экстракции, но только на фоне результатов экспериментов по исчерпывающей экстракции. Рассмотрим несколько важных параметров экстрагентов.

Водные растворы соляной кислоты являются не только наиболее простыми по составу экстрагентами, но и могут быть отнесены к так называемым «зеленым» технологиям, не наносящим вреда окружающей среде. Но при этом возникает вопрос о значимости pH водного экстрагента для сохранности экстрагируемых антоцианов вследствие возможных превращений, представленных на схеме 1. Возможное различие в результатах использования воды может быть

следствием подкисления экстракта органическими кислотами, присутствующими в образцах, уровень биосинтеза которых может сильно зависеть даже от сорта в пределах одного и того же вида растения.

В экспериментах использовали водные растворы HCl с концентрациями 0,1 М, 0,01 М, 0,001 М и водные растворы без добавок кислоты. Последовательные порции трех различных источников антоцианов, получаемые его настаиванием в течение 12 часов, объединяли перед определением концентрации антоцианов. В фиолетовой моркови по нашим данным содержатся основные два антоциана – цианидин-3-гексозилпентозилгексозид, ацилированный феруловой кислотой и без ацилирования. В корнеплодах фиолетового картофеля обнаружены 3-рутинозид-5-глюкозиды трех метилированных антоцианидинов (петунидина, пеонидина и мальвидина), ацилированные пара-кумаровой и феруловой кислотами. Антоцианы плодов аронии Мичурина образованы неацилированными гликозидами цианидина. При выборе объектов исследования руководствовались информацией о большей устойчивости ацилированных антоцианов по сравнению с неацилированными [17]. Экстракцию продолжали до достижения практически бесцветного экстракта на последней стадии. Перед измерением оптической плотности во всех полученных экстрактах pH (при разбавлении) доводили до 1. Полученные результаты для суммы экстрактов всех стадий представлены в табл. 1.

Как следует из представленных данных, понижение концентрации кислоты ниже 0,1 М нежелательно вследствие падения выхода антоцианов, причем роль стабилизации антоцианов ацилированием не всегда проявляется – наибольшие потери при экстракции водой без подкисления получены для полностью ацилированных антоцианов корнеплодов фиолетового картофеля. Следует также учесть, что могут срабатывать собственные ферментные системы растения, разрушающие антоцианы. Так, например, по нашему опыту, антоцианы из цветков цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) быстро разрушаются после сбора лепестков, поэтому для предотвращения потерь антоцианов требуется немедленное помещение их в 0,1 М водный раствор HCl. Аналогично, красные незрелые ягоды калины гордовины (*Viburnum lantana* L.) вне раствора кислоты быстро (за 2-3 часа) становятся мягкими и черными, из которых антоцианы уже не экстрагируются.

Таблица 1. Зависимость концентрации антоцианов в экстракте от концентрации HCl в водных растворах ($n = 2$)
Table 1. Relationship between anthocyanin concentration in extracts and HCl concentration in water solutions ($n = 2$)

Концентрация HCl	Морковь		Картофель		Арония	
	с, г/100 г	%	с, г/100 г	%	с, г/100 г	%
0,1	0,225±0,002	100	0,114±0,001	100	0,845±0,003	100
0,01	0,183±0,007	81	0,062±0,006	55	0,553±0,003	95
0,001	0,151±0,007	67	0,013±0,001	12	0,273±0,006	47
0	0,124±0,008	59	0,009±0,001	8	0,258±0,017	44

Добавка органического растворителя обычно осуществляется тогда, когда желают увеличить растворимость веществ, но в случае антоцианов, находящихся в кислой среде в виде положительно заряженных ионов флавилия в этом нет необходимости. Даже антоцианы дважды ацилированные замещенными коричневыми кислотами (как наиболее липофильные среди антоцианов) легко растворяются в подкисленных водных растворах. При этом антоцианы очень плохо растворяются в воде без добавок кислоты из сухого состояния. За многолетний опыт работы с антоцианами был обнаружен единственный объект, для экстракции антоцианов из которого необходимо в экстрагент добавлять органический растворитель – это плоды кизила (*Cornus mas L.*).

Экспериментально было установлено, что при экстракции 0,1 М водным раствором для обесцвечивания растительного материала (плодов кизила) требуется до шести и более стадий, хотя на первой стадии экстрагируется около 75% от суммы антоцианов, (табл. 2). При добавлении 40% (по объему) ацетонитрила удается экстрагировать практически все антоцианы за одну стадию. При повышении концентрации ацетонитрила эффективность экстракции снижается. И не удивительно, поскольку при очень высокой концентрации ацетонитрила в смеси с кислотой растворимость дигликозидов антоцианидинов сильно снижается и их не удается быстро элюировать с концентрирующих патронов С18 при очистке антоцианов методом твердофазной экстракции. Впрочем, экологически неблагоприятный ацетонитрил удобен при пробоподготовке перед определением антоцианов методами обращенно-фазовой ВЭЖХ или гидрофильной хроматографии [18].

Для трех экстрактов после одинакового разбавления, но с различной долей ацетонитрила при одинаковой концентрации соляной кислоты были получены результаты, представленные на рис. 2.

При этом было установлено батохромное смещение полос поглощения для всех экстрактов по мере добавления ацетонитрила:

– для экстракта плодов черники, содержащего неацилированные моногликозиды пяти основных антоцианидинов (дельфинидина, петунидина, мальвидина цианидина и пеонидина) – от 515 до 529 нм;

Таблица 2. Экстракция антоцианов из плодов кизила за одну стадию
Table 2. Extractivity of dogwood fruit anthocyanins for one stage

Условия экстракции		Образец				
		1	2	3	4	5
Навеска плодов кизила, <i>m</i> , г		0,493	0,525	0,498	0,620	0,550
Состав экстрагента, мл	0,1 М HCl	25	20	15	10	5
	CH ₃ CN	0	5	10	15	20
Экстрагировано антоцианов,	г/100 г	0,073	0,086	0,095	0,076	0,079
	%	76,8	90,5	100	80,0	83,2

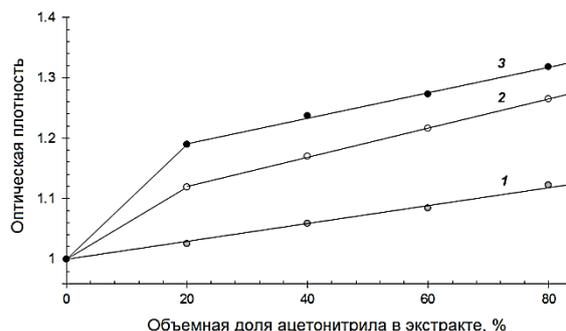


Рис. 2. Гиперхромный эффект спектров антоцианов как функция концентрации ацетонитрила. Экстракты: 1 – плодов черники; 2 – листьевв краснокочанной капусты; 3 – плодов паслена садового

Fig. 2. Hyperchromic effect of anthocyanin spectra as function of acetonitrile concentration. Extracts from: 1 – bilberry fruits; 2 – red cabbage leaves; 3 – fruits of garden nightshade

– для экстракта плодов паслена садового, содержащего ацилированный пара-кумаровой кислотой 3,5-дигликозид петунидина – от 522 до 525 нм;

– для экстракта краснокочанной капусты, содержащей моно- и диацилированные производные 3,5 дигликозида цианидина – от 522 до 525 нм.

При этом, как следует из представленных на рис. 1 данных, наблюдается гиперхромный эффект – рост оптической плотности при λ_{max} , практически линейно зависящий от концентрации ацетонитрила во всем диапазоне концентраций для экстракта плодов черники. Для ацилированных антоцианов линейность также наблюдается, но при содержании ацетонитрила выше 20% об. Изменение на начальном участке в этих случаях, вероятно, являются следствием внутримолекулярной копигментации известной для ацилированных антоцианов [19, 20].

Основная проблема при использовании растворителей, отличающихся от 0,1 М водного раствора соляной кислоты – сольватохромный эффект, который не позволяет использовать известные величины коэффициентов экстинкции для расчета концентрации антоцианов в экстрактах. Для учета сольватохромного эффекта нами использована следующая процедура:

1) вначале получали экстракт Э₁ некоторого растительного материала в 0,1 М водном растворе HCl с концентрацией антоцианов в нем c₁, для которого известно значение ε₁ для пересчета на цианидин-3-глюкозид (26900 л·моль⁻¹·см⁻¹) и определяли оптическую плотность экстракта при λ_{max}(1), D₁;

2) затем получали экстракт этого же материала в другом растворителе Э₂ с неизвестным значением ε₂ при λ_{max}(2) и определили оптическую плотность полученного экстракта (с концентрацией антоцианов в нем c₂), D₂;

3) смешивали равные объемы экстракта Э₁ и экстракта Э₂, определив оптическую плотность полученной смеси, D₁₂;

4) смешивали равные объемы экстракта Э₂ и экстракта Э₁, определив оптическую плотность полученной смеси, D₂₁.

Поскольку растворители в двух последних случаях одинаковы, соотношение концентраций антоцианов в Э₁ и Э₂ равно соотношению оптических плотностей D₁₂/D₂₁:

$$\frac{c_1}{c_2} = \frac{D_{12}}{D_{21}} \quad (1)$$

Поскольку по закону Бугера – Ламберта – Бера концентрация вещества рассчитывается по формуле

$$c_i = \frac{D_i}{\varepsilon_i \times l}, \quad (2)$$

где l – длина оптического пути, см, то для расчета неизвестного коэффициента экстинкции ε₂ использовали формулу, полученную комбинацией уравнений (1) и (2):

$$\frac{D_1 \times \varepsilon_2}{D_2 \times \varepsilon_1} = \frac{D_{12}}{D_{21}},$$

$$\varepsilon_2 = \frac{D_{12} \times D_2 \times \varepsilon_1}{D_1} \quad (3)$$

На рис. 3 представлены результаты экстракции антоцианов в пяти различных растворителях из высушенных лепестков пиона в двух вариантах – неразрушенные и измельченные. Расчет показал, что при не учете сольватохромных эффектов погрешности измерения концентрации антоцианов превышают 70%.

Первый вариант интересен тем, что позволяет оценить эффективность экстрагента по способности разрушать клеточные мембраны (рис. 2, а). При соотношении массы растительного материала и объема экстрагента 1 : 50, г/мл, лучший результат получен для 1%-го раствора HCl в этаноле, который позволил за первую экстракцию извлечь более 65% антоцианов, что более чем в 2 раза превысило аналогичный показатель для 0,1 М водного раствора HCl.

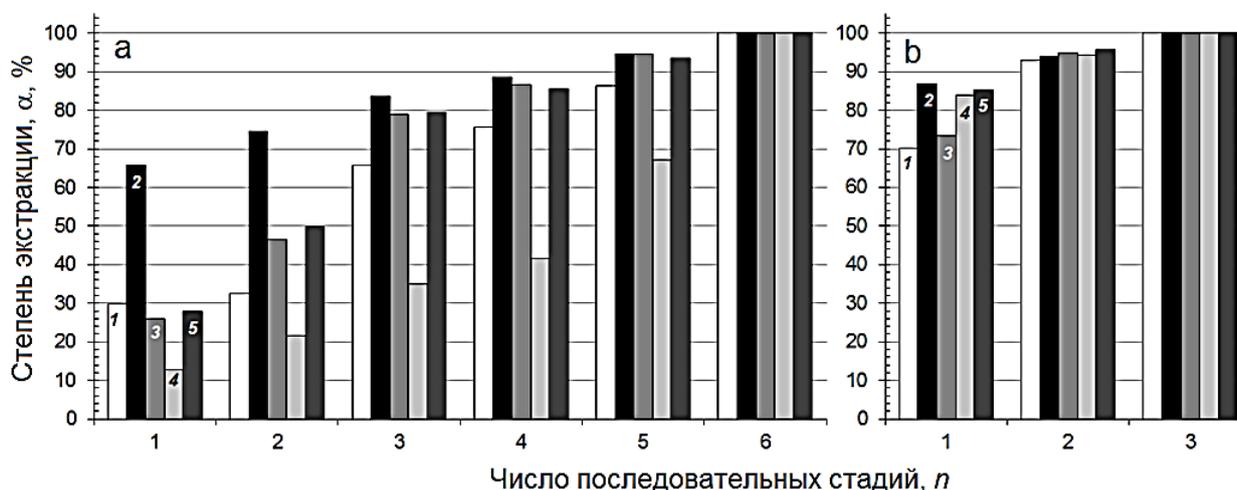


Рис. 3. Экстрагируемость антоцианов из неразрушенных (а) и растертых (б) высушенных лепестков цветков пионов от числа последовательных экстракций.

Экстрагенты: 1 – 0,1 М водный раствор HCl; 2 – 1%-й раствор концентрированной HCl в этаноле;
 3 – экстрагент, содержащий 80% об. глицерина и 20% об. 0,1 М водного раствора HCl;
 4 – экстрагент, содержащий 50% об. глицерина и 50% об. 0,1 М водного раствора HCl;
 5 – экстрагент, содержащий 50% об. 1%-го раствора концентрированной HCl в этаноле и 50% об. 0,1 М водного раствора HCl

Fig. 3. Extractivity of anthocyanins from whole (a) and crushed (b) dried peony flower petals at consecutive extraction stages.

Extragents: 1 – 0,1 M HCl solution in water; 2 – 1% HCl solution in ethanol;
 3 – mixture of 80% vol. of glycerol and 20% vol. of 0,1 M HCl solution in water;
 4 – mixture of 50% vol. glycerol and 50% vol. of 0,1 M HCl solution in water;
 5 – mixture of 50% vol. of 1% HCl solution in ethanol and 50% vol. of 0,1 M HCl solution in water

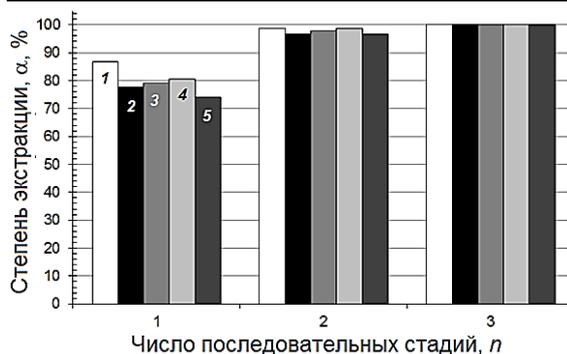


Рис. 4. Экстрагируемость антоцианов из листьев краснокочанной капусты от кратности последовательных экстракций. Условия как в подписях к рис. 3.

Fig. 4. Extractivity of red cabbage leaves anthocyanins at consecutive extraction stages. Conditions as in Fig.3

При уменьшении концентрации этанола вдвое степень экстракции несколько снижалась, но оказывалась выше, чем без добавок органического модификатора. Глицерин в количестве 80% об. позволил экстрагировать за две последовательные экстракции антоцианов больше, чем без органических добавок, но эффективность добавки глицерина уменьшалась при снижении его концентрации. Меньшая степень экс-

тракции в случае высокой концентрации глицерина может быть связана с необходимостью предварительного смачивания лепестков перед экстракцией. Во втором варианте при соотношении масса измельченных лепестков : объем экстрагента 1 : 100, г/мл – при экстракции из размолотых лепестков эффективность экстрагентов в значительной степени выровнялась, поэтому добавки органического растворителя не обязательны.

В случае свежих листьев краснокочанной капусты добавление органического модификатора в экстрагент оказалось ненужным, наивысшую эффективность в процессах экстракции проявил 0,1 М водный раствор HCl (см. рис. 3).

ВЫВОДЫ

0,1 М водный раствор HCl является эффективным и экологически чистым экстрагентом антоцианов из многих растительных объектов. Добавки органических модификаторов эффективны при экстракции из неизмельченного высушенного сырья, но при экстракции антоцианов из измельченного сырья их добавка не обязательна. При оценке их эффективности следует учитывать сольватохромный эффект по предложенному в работе способу.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Trouillas P., Sancho-García J.C., De Freitas V., Gierschner J., Otyepka M., Dangles O. Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment // *Chemical reviews*. 2016. Vol. 116. P. 4937–4982. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507>
2. Dangles O., Fenger J.-A. The chemical reactivity of anthocyanins and its consequences in food science and nutrition // *Molecules*. 2018. Vol. 23. Issue 8. 1970. <https://doi.org/10.3390/molecules23081970>
3. Wang H., Cao G., Prior R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997. Vol. 45. P. 304–309. <https://doi.org/10.1021/jf960421t>
4. Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits // *Food & Nutrition Research*. 2017. Vol. 61. Issue 1. 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
5. He F., Mu L., Yan G.-L., Liang N.-N., Pan Q.-H., Wang J., et al. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes // *Molecules*. 2010. Vol. 15. Issue 12. P. 9057–9091. <https://doi.org/10.3390/molecules15129057>
6. Martín J., Navas M.J., Jiménez-Moreno A.M., Asuero A.G. Anthocyanin pigments: Importance, sample preparation and extraction. In: Soto-Hernandes M., Palma-Tenango M., García-Mateos R. (eds.) *Phenolic Compounds. Natural Sources, Importance and Applications*. InTech; 2017. P.117–152. <https://doi.org/10.5772/66892>
7. Silva S., Costa M.E., Calhau C., Morais R.M., Pintado M.E. Anthocyanin extraction from plant issues: A review // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017. Vol. 57. Issue 14. P. 3072–3083. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1087963>
8. Ongkowijoyo P., Luna-Vital D.A., de Mejia E.G. Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update // *Food Chemistry*. 2018. Vol. 250. P. 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.055>
9. Khanh N.D. Advances in the extraction of anthocyanin from vegetables // *Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2015. Vol. 3. Issue 1. P. 126–134. <https://doi.org/10.11648/j.jfns.s.2015030102.34>
10. Garcia-Viguera C., Zafrilla P., Tomás-Barberán F.A. The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit // *Phytochemical Analysis*. 1998. Vol. 9. Issue 6. P. 274–277. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199811/12\)9:6<274::AID-PCA416>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199811/12)9:6<274::AID-PCA416>3.0.CO;2-G)
11. Zuleta-Correa A., Chinn M.S., Alfaro-Córdoba M., Truong V.-D., Yencho G.C., Bruno-Bárcena J.M. Use of unconventional mixed Acetone-Butanol-Ethanol solvents for anthocyanin extraction from Purple-Fleshed sweetpotatoes // *Food Chemistry*. 2020. Vol. 314. 125959. <https://doi.org/>

10.1016/j.foodchem.2019.125959

12. Саввин П.Н., Игнатова К.С., Ломакина А.Э. Особенности выделения антоцианов спиртами алифатического ряда // Вестник ВГУ-ИТ. 2015. N 2. С. 171–174.

13. Переверткина И.В., Волков А.Д., Болотов В.М. Влияние глицерина на экстрагирование антоциановых красителей из растительного сырья // Химия растительного сырья. 2011. N 2. С. 187–188.

14. Переверткина И.В., Волков А.Д., Титова Н.И., Болотов В.М. Оптимизация условий экстрагирования антоциановых красителей из растительного сырья // Химия растительного сырья. 2014. N 2. С. 137–141.

15. Iosub S.D., Meghea A., Geana I. Solvatochromic parameters of some anthocyanin derivatives concentrated from selective natural extracts // UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science. 2014. Vol. 76. Issue 1. P. 25–34.

16. Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative

study // Journal of AOAC International. 2005. Vol. 88. Issue 5. P. 1269–1278.

17. Bąkowska-Barczak A. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – A review // Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. 2005. Vol. 14. Issue 2. P. 107–116.

18. Deineka V.I., Deineka L.A., Saenko I.I. Regularities of anthocyanins retention in RP HPLC for “water–acetonitrile–phosphoric acid” mobile phase // Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2015. Vol. 2015. Issue 4. Article ID 732918. <https://doi.org/10.1155/2015/732918>

19. He J., Li X., Silva G.T.M., Quina F.H., Aquino A.J.A. Quantum chemical investigation of the intramolecular copigmentation complex of an acylated anthocyanin // Journal of the Brazilian Chemical Society. 2019. Vol. 30. Issue 3. P. 492–498. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180233>

20. Escribano-Bailon M.T., Santos-Buelga C. Anthocyanin Copigmentation – Evaluation, Mechanisms and Implications for the Colour of Red Wines // Current Organic Chemistry. 2012. Vol.16. Issue 6. P. 715–723. <https://doi.org/10.2174/138527212799957977>

REFERENCES

1. Trouillas P, Sancho-García JC, De Freitas V, Gierschner J, Otyepka M, Dangles O. Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. *Chemical reviews*. 2016;116:4937–4982. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507>

2. Dangles O, Fenger J-A. The chemical reactivity of anthocyanins and its consequences in food science and nutrition. *Molecules*. 2018;23(8):1970. <https://doi.org/10.3390/molecules23081970>

3. Wang H, Cao G, Prior RL. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997;45:304–309. <https://doi.org/10.1021/jf960421t>

4. Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*. 2017;61(1):1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>

5. He F, Mu L, Yan G-L, Liang N-N, Pan Q-H, Wang J, et al. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules*. 2010;15(12):9057–9091. <https://doi.org/10.3390/molecules15129057>

6. Martín J, Navas MJ, Jiménez-Moreno AM, Asuero AG. Anthocyanin pigments: Importance, sample preparation and extraction. In: Soto-Hernandes M, Palma-Tenango M, García-Mateos R. (eds.) *Phenolic Compounds. Natural Sources, Importance and Applications*. InTech; 2017, p.117–152. <https://doi.org/10.5772/66892>

7. Silva S, Costa ME, Calhau C, Morais RM, Pintado ME. Anthocyanin extraction from plant issues: A review. *Critical Reviews in Food Science*

and Nutrition. 2017;57(14):3072–3083. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1087963>

8. Ongkowijoyo P, Luna-Vital DA, de Mejia EG. Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chemistry*. 2018;250:113–126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.055>

9. Khanh ND. Advances in the extraction of anthocyanin from vegetables. *Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2015;3(1):126–134. <https://doi.org/10.11648/j.jfns.s.2015030102.34>

10. Garcia-Viguera C, Zafrilla P, Tomás-Barberán FA. The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochemical Analysis*. 1998;9(6):274–277. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199811/12\)9:6<274:AID-PCA416>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199811/12)9:6<274:AID-PCA416>3.0.CO;2-G)

11. Zuleta-Correa A, Chinn MS, Alfaro-Córdoba M, Truong V-D, Yencho GC, Bruno-Bárcena JM. Use of unconventional mixed Acetone-Butanol-Ethanol solvents for anthocyanin extraction from Purple-Fleshed sweetpotatoes. *Food Chemistry*. 2020;314:125959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125959>

12. Savvin PN, Ignatova KS, Lomakina AE. Anthocyanins aliphatic alcohols extraction features. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologii = Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2015;2:171–174. (In Russian)

13. Perevertkina IV, Volkov AD, Bolotov VM. Influence of glycerol on extraction anthocyanin dyes from raw plant material. *Khimija rastitel'nogo syr'ja = Chemistry of plant raw material*. 2011;2:187–188. (In Russian)

14. Perevertkina IV, Volkov AD, Titova NI, Bo-

lotov VM. Optimization of conditions for anthocyanin dyes extraction from the vegetable materials. *Khimiya rastitel'nogo syr'ja = Chemistry of plant raw material*. 2014;2:137–141. (In Russian)

15. Iosub SD, Meghea A, Geana I. Solvatochromic parameters of some anthocyanin derivatives concentrated from selective natural extracts. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*. 2014;76(1):25–34.

16. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*. 2005;88(5):1269–1278.

17. Bąkowska-Barczak A. Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants – A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*.

2005;14(2):107–116.

18. Deineka VI, Deineka LA, Saenko II. Regularities of anthocyanins retention in RP HPLC for “water–acetonitrile–phosphoric acid” mobile phase. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 20115;2015(4). Article ID 732918. <https://doi.org/10.1155/2015/732918>

19. He J, Li X, Silva GTM, Quina FH, Aquino AJA. Quantum chemical investigation of the intramolecular copigmentation complex of an acylated anthocyanin. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2019;30(3):492–498. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180233>

20. Escribano-Bailon MT, Santos-Buelga C. Anthocyanin Copigmentation – Evaluation, Mechanisms and Implications for the Colour of Red Wines. *Current Organic Chemistry*. 2012;16(6):715–723. <https://doi.org/10.2174/138527212799957977>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Саласина Ярослава Юрьевна,
аспирант,
Институт фармации, химии и биологии
Белгородского государственного
национального исследовательского
университета,
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85,
Российская Федерация,
e-mail: kulchenko@bsu.edu.ru

Калинкин Данила Андреевич,
Институт фармации, химии и биологии
Белгородского государственного
национального исследовательского
университета,
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85,
Российская Федерация,
e-mail: 1318753@bsu.edu.ru

Дейнека Виктор Иванович,
д.х.н., профессор,
профессор кафедры общей химии,
Институт фармации, химии и биологии
Белгородского государственного
национального исследовательского
университета,
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85,
Российская Федерация,
✉ e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Дейнека Людмила Александровна,
к.х.н., доцент,
доцент кафедры общей химии,
Институт фармации, химии и биологии
Белгородского государственного
национального исследовательского
университета,
308015, г. Белгород, ул. Победы, 85,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yaroslava Yu. Salasina,
Postgraduate Student,
Institute of Pharmacy, Chemistry and Biology,
Belgorod State National Research University,
85, Pobedy St., Belgorod, 308015,
Russian Federation,
e-mail: kulchenko@bsu.edu.ru

Danila S. Kalinikin,
Institute of Pharmacy, Chemistry and Biology,
Belgorod State National Research University,
85, Pobedy St., Belgorod, 308015,
Russian Federation,
e-mail: 1318753@bsu.edu.ru

Viktor I. Deineka,
Dr. Sci (Chemistry), Professor,
Department of General Chemistry,
Institute of Pharmacy, Chemistry and Biology,
Belgorod State National Research University,
85, Pobedy St., Belgorod, 308015,
Russian Federation,
✉ e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Lyudmila A. Deineka,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Department of General Chemistry,
Institute of Pharmacy, Chemistry and Biology,
Belgorod State National Research University,
85, Pobedy St., Belgorod, 308015,
Russian Federation,
e-mail: deyneka@bsu.edu.ru

Российская Федерация,
e-mail: deyneka@bsu.edu.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Статья поступила в редакцию 20.05.2020; одобрена после рецензирования 14.11.2020; принята к публикации 30.11.2020.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

The article was submitted 20.05.2020; approved after reviewing 14.11.2020; accepted for publication 30.11.2020.

Оригинальная статья / Original article

УДК 665.3:678

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-700-707>



Повышение биоразлагаемости эпоксидных материалов за счет модификации растительными маслами и их кислородсодержащими производными

© Е.М. Готлиб, Т.В. Вдовина, Е.С. Ямалеева

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
г. Казань, Российская Федерация

Резюме: Проблема утилизации изделий из эпоксидных смол является актуальной задачей в связи с микробиологической стойкостью данного типа полимера. Целью настоящей работы являлось повышение биоразлагаемости эпоксидных материалов под действием микроорганизмов почвы и мицелиальных грибов за счет модификации соевым маслом и маслом каучукового дерева и их кислородсодержащими производными, а также смесью соевого масла с олеиновой кислотой. Согласно полученным результатам, внесение в почву материала на основе немодифицированной эпоксидной смолы приводит к снижению дыхательной активности почвенного микробиоценоза в 2,2 раза по сравнению с дыхательной активностью почвы без полимеров. Это свидетельствует о том, что эпоксидно-диановая смола или отвердитель (аминофенол) оказывают ингибирующее действие на микробиоценоз почвы. Модификация эпоксидной смолы растительными маслами и их кислородсодержащими производными обуславливает увеличение дыхательной активности почвенного микробиоценоза по сравнению с дыхательной активностью почвы в присутствии немодифицированной эпоксидной смолы, что указывает на их биоразлагаемость. Снижение содержания карбоновых кислот в составе масла каучукового дерева после оксидирования, на что указывает уменьшение кислотного числа, приводит к некоторому снижению дыхательной активности микробиоценоза почвы. Аналогичный эффект по этой же причине оказывает карбонизация растительных масел. На увеличение биодegradации эпоксидных материалов при модификации указывают и результаты оценки их грибостойкости по степени развития плесневелых грибов рода *Trichoderma*. Таким образом, установлено, что растительные масла и их кислородсодержащие производные увеличивают биоразложение эпоксидных материалов. При этом из всех исследованных вариаций составов наибольшей биоразлагаемостью характеризуются эпоксидные материалы, модифицированные маслом каучукового дерева и смесью соевого масла с олеиновой кислотой.

Ключевые слова: эпоксидный полимер, растительные масла, биодegradуемость, микробиоценоз почвы, грибостойкость

Для цитирования: Готлиб Е.М., Вдовина Т.В., Ямалеева Е.С. Повышение биоразлагаемости эпоксидных материалов за счет модификации растительными маслами и их кислородсодержащими производными. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 4. С. 700–707. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-700-707>

Increasing the biodegradability of epoxy materials by means of vegetable oils and their oxygenated derivatives

Elena M. Gotlib, Tatyana V. Vdovina, Ekaterina S. Yamaleeva

Kazan National Research Technological University,
Kazan, Russian Federation

Abstract: Recycling of epoxy resin products is an urgent problem due to the microbiological resistance of such polymers. In this work, we aimed to increase the biodegradability of epoxy materials under the action of soil microorganisms and mycelial fungi. The modification of epoxy materials was carried out using soybean oil, rubber tree oil and their oxygenated derivatives, as well as a mixture of soybean oil and oleic acid. According to the obtained results, the introduction of a material based on unmodified epoxy resin into a soil leads to a 2.2-fold decrease in the respiratory activity of the soil microbiocenosis compared to untreated soil samples. This proves that epoxy-diane resins or hardeners (aminophenol) inhibit soil microbiocenosis. In comparison with the action of unmodified epoxy resins, the epoxy resins treated with vegetable oils and their

oxygenated derivatives caused an increase in the respiratory activity of soil microbiocenosis, thus indicating the biodegradability of the materials under study. The decrease in the content of carboxylic acids in the composition of rubber tree oil after its epoxidation, which was confirmed by a decrease in the acid value, led to a slight decrease in the respiratory activity of soil microbiocenosis. For the same reason, the carbonation of vegetable oils had a similar effect. An improved biodegradation profile of epoxy materials following their modification was also confirmed by assessing their fungal resistance in terms of the number of the *Trichoderma* fungi. It was concluded that vegetable oils and their oxygenated derivatives increase the biodegradability of epoxy materials. Among all the studied compositions, the epoxy materials modified with rubber tree oil and a mixture of soybean oil and oleic acid demonstrated the highest level of biodegradability.

Keywords: epoxy polymer, vegetable oils, biodegradability, soil microbiocenosis, fungal resistance

For citation: Gotlib EN, Vdovina TV, Yamaleeva ES. Increasing the biodegradability of epoxy materials by means of vegetable oils and their oxygenated derivatives. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4): 700–707. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-700-707>

ВВЕДЕНИЕ

Одним из аспектов решения вопросов экологической безопасности является уменьшение объемов «полимерного мусора». Для решения этой задачи перспективно получение полимерных материалов, сохраняющих свои эксплуатационные характеристики на протяжении периода использования, а затем претерпевающих биологические и физико-химические превращения, происходящие под действием факторов окружающей среды и с легкостью включающиеся в процессы метаболизма природных систем [1].

Проблема утилизации после завершения срока эксплуатации является особенно актуальной для изделий из эпоксидных смол ввиду микробиологической стойкости этого типа полимеров [2].

Рост биоразлагаемости эпоксидных материалов может достигаться за счет модификации биоразлагаемыми природными добавками, способными в определенной степени инициировать распад основного полимера [3].

Добавками, придающими композитам способность к биоразложению, являются целлюлоза и ее производные, крахмал, растительные масла, а также отходы растительного производства, которые получают при переработке злаковых культур [4]. Цель настоящей работы заключалась в повышении биоразлагаемости под действием микроорганизмов почвы и мицелиальных грибов эпоксидных материалов, модифицированных растительными маслами и их кислородсодержащими производными.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для получения модифицированных композиций использовалась эпоксидная диановая смола ЭД-20 (ГОСТ 10587-84), отвержденная аминоалкилфенолом (АФ-2) (ТУ 2494-052-00205423-2004). Содержание отвердителя определялось эквивалентным соотношением [эпоксигруппы]:[амин] и [циклокарбонаты]:[амин]. Отверждение проводилось при комнатной температуре в течение 7 суток.

В качестве модификаторов использовались:

– промышленное масло каучукового дерева (МКД), полученное из семян гевеи бразильской (*Hevea brasiliensis*), произрастающей на территории юга Вьетнама (TCVN 5374:2008);

– эпоксидированное масло каучукового дерева (ЭМКД), синтезированное по методике, описанной в работе [5];

– соевое масло (СМ) ГОСТ Р 53510-2009;

– эпоксидированное соевое масло (ЭСМ) (ТУ 0253-061-07510508-2012) с содержанием эпоксидного кислорода (ЭК) 6,2% масс.;

– циклокарбонат эпоксидированного масла каучукового дерева (ЦКЭМКД) с 95% конверсией эпоксигрупп в циклокарбонатные, синтезированного по методике, приведенной в работе [6];

– смесь соевого масла с олеиновой кислотой (СМ+ОК), в соотношении 3:1.

Оценку биоразлагаемости (биодоступности) материалов производили на основании изменения дыхательной активности почвы методом Штурма [7].

Оценку грибостойкости материалов осуществляли на основании стандартного метода лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов (ГОСТ 9.049-89).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценка изменения дыхательной активности микробиоценоза почвы в присутствии растительных масел и их кислородсодержащих производных показала, что эти соединения являются биодоступными для микроорганизмов. Наибольшее увеличение описываемого показателя имеет место в случае МКД и СМ+ОК (рис. 1). Это свидетельствует о том, что карбоновые кислоты эффективно используются микроорганизмами почвы в качестве субстрата. Снижение их содержания в составе МКД после эпоксидирования, на что указывает уменьшение кислотного числа [8], приводит к некоторому уменьшению дыхательной активности микробиоценоза почвы. Аналогичный эффект оказывает карбонизация по этой же причине. Дыхательная активность

микробиоценоза почвы в присутствии соевого масла заметно меньше, по сравнению с МКД, что также может быть связано с отсутствием в его составе свободных жирных кислот. Эпоксидирование СМ, в отличие от МКД, несколько увеличивает биоразлагаемость в почве. Вероятно, выявленная закономерность определена различным способом эпоксидирования этих растительных масел в промышленных и лабораторных условиях [9].

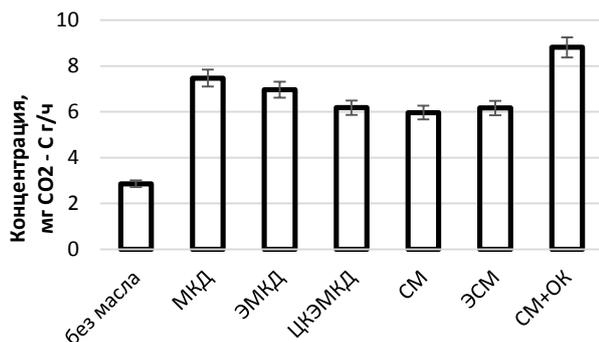


Рис. 1. Дыхательная активность почвы в присутствии растительных масел, их кислородсодержащих производных и смеси соевого масла с олеиновой кислотой

Fig. 1. Soil respiratory activity in the presence of vegetable oils, their oxygen-containing derivatives and a mixture of soybean oil with oleic acid

Результаты оценки изменения дыхательной активности микробиоценоза почвы в присутствии полимерных материалов на основе эпоксидной смолы, модифицированной растительными маслами и их кислородсодержащими производными, представлены на рис. 2.

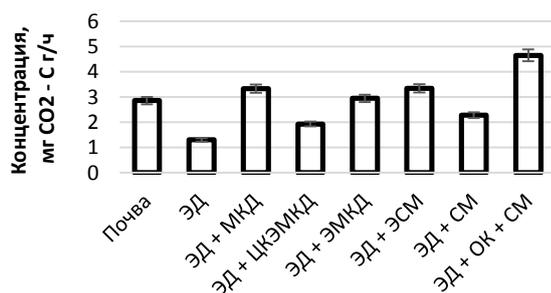


Рис. 2. Дыхательная активность почвы в присутствии полимерных материалов на основе эпоксидной смолы, не модифицированной и модифицированной маслом каучукового дерева, соевым маслом и их производными (содержание модификаторов 10 мас.ч на 100 мас.ч ЭД-20)

Fig. 2. Soil respiratory activity in the presence of polymeric materials based on epoxy resin, not modified and modified by rubber tree oil, soybean oil and their derivatives (modifiers content is 10 parts by weight per 100 parts by weight of ED-20)

Как показали проведенные исследования, внесение в почву материала, полученного на основе немодифицированной эпоксидной смолы (образец ЭД), приводит к снижению дыхательной активности почвенного микробиоценоза в 2,2 раза по сравнению с дыхательной активностью почвы без полимеров. Это свидетельствует о том, что эпоксидно-диановая смола или отвердитель аминафенол оказывают ингибирующее действие на микробиоценоз почвы [10-12].

Согласно полученным данным, модификация эпоксидной смолы МКД обуславливает увеличение дыхательной активности почвенного микробиоценоза в 2,5 раза по сравнению с дыхательной активностью почвы в присутствии немодифицированной эпоксидной смолы. На основании сказанного можно заключить, что МКД в качестве субстрата используется такими микроорганизмами почвы, как неспорозные палочки *Pseudomonas fluorescens*, многие аэробные и анаэробные бактерии (например, рр. *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*) и мицелиальные грибы (например, рр. *Penicillium*, *Aspergillus*) [13]. Биодegradируемость МКД обусловлена, вероятно, наличием в его структуре большого количества ненасыщенных жирных кислот, то есть двойных связей, не стойких к агрессивным воздействиям продуктов метаболизма микроорганизмов.

Использование в качестве модификатора эпоксидных материалов ЭМКД обуславливает незначительное снижение дыхательной активности почвы по сравнению с МКД (см. рис. 2).

В то же время модификация ЦКЭМКД обуславливает существенное уменьшение – в 1,8 раза, дыхательной активности почвенного микробиоценоза по сравнению с дыхательной активностью при модификации МКД (см. рис. 2). Это можно объяснить тем, что циклокарбонаты эпоксидированных растительных масел (ЦКЭРМ) способны образовывать в эпоксидной сетке гидроксипуретановые фрагменты, которые обуславливают рост поперечного сшивания эпоксидных материалов в результате взаимодействия модификаторов с аминными отвердителями и встраиванием их в эпоксидную сетку [14–16]. Исходя из этого можно сделать вывод, что микроорганизмам почвы сложнее разрушить структуру ЦКЭРМ и использовать их в качестве субстрата.

Следует отметить, что наблюдается хорошая корреляция данных, представленных на рис. 1 и 2. То есть растительные масла, которые наименее устойчивы к микроорганизмам почвы, обеспечивают и большее биоразложение модифицированных ими эпоксидных материалов.

Согласно полученным экспериментальным данным, модификация эпоксидной смолы соевым маслом обуславливает повышение дыхательной активности почвенного микробиоценоза в 1,8 раза по сравнению с дыхательной активностью почвы в присутствии немодифицированной

эпоксидной смолы. Это свидетельствует о том, что это растительное масло также используется в качестве питательного субстрата [10].

Полученные результаты согласуются с литературными данными об использовании группами микроорганизмов *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Endomycopsis fibuligera* растительных масел в качестве субстрата [10].

Интересно отметить, что МКД в значительно большей степени увеличивает биodeградируемость эпоксидных материалов при захоронении в почве по сравнению с соевым маслом. Это связано с наличием в его составе большего количества ненасыщенных жирных кислот. Действительно, литературные данные указывают на большее биоразложение соединений с двойными связями в молекуле [17, 18]. При этом использование в качестве модифицирующей добавки эпоксидированного соевого масла обуславливает увеличение выделения углекислого газа в 2,6 раза, что коррелирует с данными, представленными на рис. 1, эпоксидирование

соевого масла делает его более доступным в качестве субстрата.

Следует отметить, что эффект эпоксидирования СМ в большей степени оказывает влияние на биodeградируемость модифицированных им эпоксидных материалов, чем самого модификатора.

Использование в качестве модифицирующей добавки смеси соевого масла с олеиновой кислотой увеличивает дыхательную активность почвенного микробиоценоза в 4 раза по сравнению с немодифицированным материалом (см. рис. 2). Это также коррелирует с данными по биodeградируемости этой смеси (см. рис 1) и еще раз подтверждает положительное влияние ненасыщенных жирных кислот на биоразложение эпоксидных материалов.

Результаты оценки грибостойкости исследуемых эпоксидных материалов по степени развития плесневелых грибов рода *Trichoderma* представлены в табл. 1.

Таблица 1. Грибостойкость отвержденных АФ-2 эпоксидных материалов, модифицированных маслом каучукового дерева и его производными

Table 1. Fungal resistance of AF-2 cured epoxy materials modified with rubber tree oil and its derivatives

Образец	Средний балл	Характеристика	Внешний вид
Немодифицированная композиция	1	Под микроскопом виден слабо развитый мицелий белого цвета	
Модифицированная МКД	3	Невооруженным глазом отчетливо видно развитие грибов. Видны споры зеленого и белого цвета по всей поверхности образца	
Модифицированная ЭМКД	2	Виден зеленый мицелий в большей степени по краям образца. Под микроскопом виден слабо развитый мицелий белого цвета	
Модифицированная ЦКЭМКД	3	Невооруженным глазом виден мицелий зеленого цвета	

Примечание. Содержание модификаторов 10 мас.ч на 100 мас.ч ЭД-20¹.

¹Sierra G. A Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates // Antonie van Leeuwenhoek. 1957. Vol. 23. P. 15–22.

Согласно представленным результатам, немодифицированная эпоксидная смола характеризуется высокой грибостойкостью, так как лишь при микроскопировании было обнаружено незначительное обрастание ее плесневелыми грибами рода *Trichoderma* [10]. При этом модификация МКД и его эпоксидированной производной увеличивает балл, отражающий степень деградации материалов под воздействием грибов, с 1 до 3 и 2 соответственно. Таким образом, имеет место увеличение биodeградируемости эпоксидных материалов под действием микромицетов, проявляющееся в большей степени при применении в качестве модификатора МКД (см. табл. 1).

Модификация ЦКЭМКД обуславливает грибостойкость в 3 балла. Это означает, что при визуальном наблюдении мицелий и споры слабо видны, но при микроскопировании наблюдается их развитие [19]. Следовательно, этот модификатор также обуславливает рост биоразложения эпоксидных материалов.

Проводя сравнение данных по дыхательной активности почвы и оценке грибостойкости эпоксидных материалов в зависимости от их состава, можно говорить о том, что образцы, модифицированные МКД, используются микроорганизмами в качестве субстрата и являются биодоступными

для них.

В табл. 2. представлены результаты оценки степени развития грибов рода *Trichoderma* на образцах эпоксидных материалов, модифицированных соевым маслом и его эпоксидированной производной.

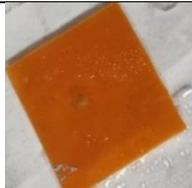
На основании полученных экспериментальных данных, представленных в табл. 2, можно сделать заключение, что модификация СМ не увеличивает биodeградируемость эпоксидных материалов под действием мицелиальных грибов по сравнению с немодифицированным полимером в отличие от МКД (см. табл. 1).

В то же время ЭСМ повышает биоразложение по сравнению с модификацией СМ. В этом случае средний балл 3, то есть на том же уровне, что для композиций с МКД и циклокарбонатом на его основе.

Подобные результаты наблюдаются и при определении дыхательной активности почвы (см. рис. 2). ЭСМ показало лучший результат по биodeградируемости под действием мицелиальных грибов по сравнению с немодифицированной эпоксидной смолой, а также эпоксидной смолой, модифицированной СМ. Этот показатель достигается на уровне эпоксидной композиции, модифицированной МКД [20].

Таблица 2. Грибостойкость отвержденных АФ-2 эпоксидных материалов, модифицированных соевым маслом и эпоксидированным соевым маслом

Table 2. Fungal resistance of AF-2 cured epoxies modified with soybean oil and epoxidized soybean oil

Образец	Средний балл	Характеристика	Внешний вид
СМ	1	Под микроскопом виден слабо развитый мицелий	
ЭСМ	3	Невооруженным глазом видны споры и мицелий зеленого и черного цвета, рост не очень активный	

Примечание. Содержание модификаторов 10 мас.ч на 100 мас.ч ЭД-20¹.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что эпоксидная смола и аминофенольный отвердитель не используются микроорганизмами почвы в качестве субстрата. Но при этом как соевое, так и масло каучукового дерева и их функционализированные производные являются биодоступными для них.

Установлено, что из всех исследованных ва-

риаций составов наибольшей биоразлагаемостью характеризуются эпоксидные материалы, модифицированные маслом каучукового дерева и смесью соевого масла с олеиновой кислотой. Следовательно, наличие в рецептуре эпоксидных композиций ненасыщенных жирных кислот ускоряет их биоразложение в почве после окончания срока службы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Фомин В.А., Гузев В.В. Биоразлагаемые полимеры, состояние и перспективы использования // Пластические массы. 2001. N 2. С. 42–48.
2. Рыбкина С.П., Пахаренко В.А., Шостак Т.С.,

Пахаренко В.В. Основные направления в области создания биоразлагаемых термопластов // Пластические массы. 2008. N 10. С. 47–54.

3. Костин А. Биопластики: перспективы в

России // Пластикс. 2015. N 3 (143). С. 44–50. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.plastics.ru/pdf/journal/2015/03/Kostin.pdf> (30.09.2020)

4. Прохоренко С.В., Иванчева А.Д. Состояние и проблемы утилизации полимерных материалов // Полимеры-деньги. 2007. N 4. С. 27–32.

5. Милославский Д.Г., Ахмедьянова Р.А., Турманов Р.А., Кочнев А.М., Харлампида Х.Э., Дык В.М. [и др.]. Влияние природы растительных масел на процесс их эпоксирирования пероксидом водорода в присутствии пероксофосфатовольфраматной каталитической системы // Вестник технологического университета. 2015. Т. 18. N 18. С. 25–28.

6. Kozhevnikov I.V., Mulder G.P., Steverink-de Zoete M.C., Oostwal M.G. Epoxidation of oleic acid catalyzed by peroxy phosphotungstate in a two-phase system // Journal of Molecular Catalysis A: Chemical. 1998. Vol. 134. Issue 1-3. P. 223–228 [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(98\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(98)00039-9)

7. Abdou A.M. Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase // Journal of Dairy Science. 2003. Vol. 86. Issue 1. P. 127–132. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73591-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73591-7)

8. Gotlib E., Nguyen L., Yanov V., Sokolova A. Study of resistance to climatic factors of epoxy coatings modified by plant oils and their functionalized derivatives // E3S Web of Conferences. XXII International Scientific Conference “Construction the Formation of Living Environment” (FORM-2019) 2019. Vol. 97. 6 p. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20199702002>

9. Patil H., Waghmare J. Catalyst for epoxidation of oils: a review // Discovery. 2013. Vol. 3. Issue 7. P. 10–14.

10. Зазуля А.Н., Нагорнов С.А., Романцова С.В., Малахов К.С. Получение биодизельного топлива из растительных масел // Достижения науки и техники АПК. 2009. N 12. С. 58–59.

11. Gotlib E., Nya H.P.T., Nguyen T.L.A., Sokolova A.G., Yamaleeva E., Musin I. Agricultural by-products as advanced raw materials for obtaining modifiers and fillers for epoxy materials // Key Engineering Materials. 2019. Vol. 822. P. 343–349. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.822.34>

12. Готлиб Е.М., Рахматуллина А.П., Нгуен Т.Л.А., Чан Х.Т., Ха Т.Н.Ф. Отходы сельскохозяйственного производства – перспективное сырье

для химической промышленности: монография. Германия: Lambert Academic Publishing, 2019. 209 с.

13. İlkiliç C., Yücesu H.S. Investigation of the effect of sunflower oil methyl ester on the performance of a diesel engine // Energy Sources. 2006. Vol. 27. Issue 13. P. 1225–1234. <https://doi.org/10.1080/009083190519311>

14. Becker P., Köster D., Popov M.N., Markosian S., Antranikian G., Märkl H. The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions // Water Research. 1999. Vol. 33. Issue 3. P. 653–660. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00253-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00253-X)

15. Готлиб Е.М., Черезова Е.Н., Ильичева Е.С., Медведева К.А. Эпоксидные сополимеры. Отверждение, модификация, применение в качестве клеев: монография. Казань: Изд-во КНИТУ. 2014. 116 с.

16. Готлиб Е.М., Милославский Д.Г., Медведева К.А., Хасанова А.Р., Черезова Е.Н. Эпоксидные клеи, модифицированные циклокарбонатами // Вестник технологического университета. 2015. Т. 18. N 21. С. 74–76.

17. Meier M.A.R., Metzger J.O., Schubert U.S. Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science // Chemical Society Reviews. 2007. Vol. 36. Issue 11. P. 1788–1802. <https://doi.org/10.1039/B703294C>

18. Il'icheva E.S., Khusainov A.D., Cherezova E.N., Gotlib E.M. High-molecular-weight modifiers with graft anhydride and imide groups: Effect on the adhesion, rheological, and physicomechanical properties of rubber compounds // International Polymer Science and Technology. 2015. Vol. 42. Issue 6. P. T/17–T/20.

19. Wang Z.-Y., Xu Y., Wang H.-Y., Zhao J., Gao D.-M., Li F.-M. et al. Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms // Pedosphere. 2012. Vol. 22. Issue 5. P. 717–725. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(12\)60057-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(12)60057-5)

20. Abduh M.Y., Igbal M., Picchioni F., Manurung R., Heeres H.J. Synthesis and properties of cross-linked polymers from epoxidized rubber seed oil and triethylenetetramine // Journal of Applied Polymer Science. 2015. Vol. 132. Issue 40. 12 p. <https://doi.org/10.1002/app.42591>

REFERENCES

1. Fomin VA, Guzeev VV. Biodegradable polymers, state and perspective of use. *Plasticheskiye massy*. 2001;2:42–45. (In Russian)

2. Rybkina SP, Pakharenko VA, Shostak TS. The main directions in the field of creating biodegradable thermoplastics. *Plasticheskiye massy*. 2008;10:47–54. (In Russian)

3. Kostin A. Bioplastics: prospects in Russia. *Plastiks*. 2015;3:44–50. Available from: <https://www.plastics.ru/pdf/journal/2015/03/Kostin.pdf> [Accessed 30th September 2020]. (In Russian)

4. Prokhorenko SV, Ivancheva AD. State and problems of utilization of polymeric materials. *Polimery-den'gi*. 2007;4:27–32. (In Russian)

5. Miloslavskii DG, Akhmedyanova RA, Turmanov RA, Kochnev AM, Kharlampidi KE, Duc VM, et al. Influence of vegetable oils nature on the process of their epoxidation with hydrogen peroxide

in the presence of a peroxophospho-tungstate catalytic system. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta*. 2015;18(18):25-28. (In Russian)

6. Kozhevnikov IV, Mulder GP, Steverink-de Zoete MC, Oostwal MG. Epoxidation of oleic acid catalyzed by peroxo phosphotungstate in a two-phase system. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 1998;134(1-3):223-228
[https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(98\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(98)00039-9)

7. Abdou AM. Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *Journal of Dairy Science*. 2003;86(1):127-132.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73591-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73591-7)

8. Gotlib E, Nguyen L, Yanov V, Sokolova A. Study of resistance to climatic factors of epoxy coatings modified by plant oils and their functionalized derivatives. *E3S Web of Conferences*. XXII International Scientific Conference "Construction the Formation of Living Environment" (FORM-2019) 2019;97. 6 p. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20199702002>

9. Patil H, Waghmare J. Catalyst for epoxidation of oils: a review. *Discovery*. 2013;3(7):10-14.

10. Zazulya AN, Nagornov SA, Romantsova SV, Malakhov KS. Reception biofuel from vegetable oils. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 2009;12:58-59. (In Russian)

11. Gotlib E, Nya HPT, Nguyen TLA, Sokolova AG, Yamaleeva E, Musin I. Agricultural by-products as advanced raw materials for obtaining modifiers and fillers for epoxy materials. *Key Engineering Materials*. 2019;822:343-349. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.822.343>

12. Gotlib EM, Rakhmatullina AP, Nguyen TLA, Chan HT, Ha TNF. *Agricultural waste is a promising raw material for the chemical industry*. Germany: Lambert Academic Publishing; 2019. 209 p. (In Russian)

13. İlkiliç C, Yücesu HS. Investigation of the effect of sunflower oil methyl ester on the performance of a diesel engine. *Energy Sources*.

2006;27(13):1225-1234. <https://doi.org/10.1080/009083190519311>

14. Becker P, Köster D, Popov MN, Markossian S, Antranikian G, Märkl H. The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions. *Water Research*. 1999;33(3):653-660. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00253-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00253-X)

15. Gotlib EM, Cherezova EN, Il'icheva ES, Medvedeva KA. *Epoxy copolymers, curing, modification, use as adhesives*. Kazan: Izdatel'stvo Kazanskogo natsional'nogo issledovatel'skogo tekhnologicheskogo universiteta; 2014. 116 p. (In Russian)

16. Gotlib EM, Miloslavskiy DG, Medvedeva KA, Khasanova AR, Cherezova EN. Epoxy adhesives modified with cyclocarbonates. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta*. 2015;18(21):74-76. (In Russian)

17. Meier MAR, Metzger JO, Schubert US. Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science. *Chemical Society Reviews*. 2007;36(11):1788-1802. <https://doi.org/10.1039/B703294C>

18. Il'icheva ES, Khusainov AD, Cherezova EN, Gotlib EM. High-molecular-weight modifiers with graft anhydride and imide groups: Effect on the adhesion, rheological, and physicomechanical properties of rubber compounds. *International Polymer Science and Technology*. 2015;42(6):T/17-T/20.

19. Wang Z-Y, Xu Y, Wang H-Y, Zhao J, Gao D-M, Li F-M. et al. Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms. *Pedosphere*. 2012;22(5):717-725. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(12\)60057-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(12)60057-5)

20. Abduh MY, Igbal M, Picchioni F, Manurung R, Heeres HJ. Synthesis and properties of cross-linked polymers from epoxidized rubber seed oil and triethylenetetramine. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015;132(40). 12 p. <https://doi.org/10.1002/app.42591>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Готлиб Елена Михайловна,
д.т.н., профессор кафедры технологии
синтетического каучука,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68,
Российская Федерация,
✉ e-mail: egotlib@yandex.ru

Вдовина Татьяна Владимировна,
к.т.н., доцент кафедры промышленной
биотехнологии,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68,
Российская Федерация,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena M. Gotlib,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Department of Synthetic Rubber Technologies,
Kazan National Research Technological
University,
68, K. Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
✉ e-mail: egotlib@yandex.ru

Tatyana V. Vdovina,
Cand. Sci (Engineering),
Associate Professor,
Department of Industrial Biotechnology,
Kazan National Research Technological
University,
68, K. Marx St., Kazan, 420015,

e-mail: tvkirilina@gmail.com

Russian Federation,
e-mail: tvkirilina@gmail.com

Ямалеева Екатерина Сергеевна,
К.т.н., доцент кафедры медицинской
инженерии,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68,
Российская Федерация,
e-mail: curls888@yandex.ru

Ekaterina S. Yamaleeva,
Cand. Sci (Engineering),
Associate Professor,
Department of Medical Engineering,
Kazan National Research Technological
University,
68, K. Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
e-mail: curls888@yandex.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*Статья поступила в редакцию 22.10.2020;
одобрена после рецензирования 19.11.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

*The article was submitted 22.10.2020;
approved after reviewing 19.11.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 57.013:57.014

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-708-718>



Биосинтез экзополисахаридов почвенными бактериями *Paenibacillus mucilaginosus* на питательной среде с мелассой

© Т.З. Ха*, А.В. Канарский*, З.А. Канарская*, А.В. Щербаков**,
Е.Н. Щербакова**

*Казанский национальный исследовательский технологический университет,
г. Казань, Республика Татарстан, Россия

**ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург, Россия

Резюме: Бактериальные экзополисахариды с влагоудерживающими и цементирующими свойствами играют очень важную роль в формировании и стабилизации почвенных агрегатов, регулировании питательных веществ и потока воды через корни растений, снижении солевого стресса в растениях. При внесении в почву бактерий, продуцирующих экзополисахариды, растения более устойчивы к водному стрессу благодаря улучшению структуры и значительному накоплению пролина, сахаров и свободных аминокислот в условиях дефицита воды. Целью настоящей работы являлось определение эффективности биосинтеза экзополисахаридов почвенными бактериями *Paenibacillus mucilaginosus* при культивировании на питательной среде, приготовленной на основе мелассы. В экспериментах использованы продуценты экзополисахаридов – штаммы бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574, предоставленные Ведомственной коллекцией непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург). Для определения влияния условий культивирования на синтез экзополисахаридов бактериями *P. mucilaginosus* применен метод «один фактор за один раз» (one-factor-at-a-time – OFAT). По результатам исследований выбраны наиболее эффективный продуцент экзополисахаридов, возраст и дозы инокулята, оптимальные значения температуры культивирования и pH среды, источник азота и его концентрации, а также определены условия аэрации, влияющие на биосинтез экзополисахаридов и рост выбранного штамма бактерий *P. mucilaginosus*. Установлено, что наиболее эффективным продуцентом экзополисахаридов является штамм *P. mucilaginosus* 574. Показано, что для биосинтеза экзополисахаридов культивирование данного штамма целесообразно и экономично проводить на питательной среде с 2% мелассы без дополнительного внесения минеральных веществ и азота. Максимальное количество экзополисахаридов может достигать 9,55 г/л в питательной среде с 2% мелассы объемом 50 мл с добавлением 0,1% кукурузного экстракта как индуктора синтеза экзополисахаридов при температуре культивирования 30 ± 1 °C, pH среды $6,0 \pm 0,2$ с внесением 5% инокулята после 24 ч. инокуляции. Полученные результаты исследований рекомендуется использовать при создании технологии производства микробиологических удобрений.

Ключевые слова: меласса, *Paenibacillus mucilaginosus*, экзополисахариды, условия культивирования

Для цитирования: Ха Т.З., Канарский А.В., Канарская З.А., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н. Биосинтез экзополисахаридов почвенными бактериями *Paenibacillus mucilaginosus* на питательной среде с мелассой. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 4. С. 708–718. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-708-718>

Biosynthesis of exopolysaccharides by soil bacteria *Paenibacillus mucilaginosus* on a nutrient molasses medium

Dung T. Ha*, Albert V. Kanarsky*, Zosia A. Kanarskaya*, Andrei V. Shcherbakov**,
Elena N. Shcherbakova**

* Kazan National Research Technological University, Russian Federation

** All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology,
St. Petersburg, Russian Federation

Abstract: Bacterial exopolysaccharides exhibiting water-retaining and cementing properties play an essential role in such processes as the formation and stabilization of soil aggregates, regulation of nutrients and

water flow through plant roots, as well as reduction of salt stress in plants. When bacteria producing exopolysaccharides are introduced into a soil, plants become more resistant to water stress due to improved structure and significant accumulation of proline, sugars and free amino acids under the conditions of water deficiency. In this work, we set out to determine the efficiency of exopolysaccharide biosynthesis by the soil bacteria *Paenibacillus mucilaginosus* when cultivated on a nutrient molasses medium. The bacterial strains *P. mucilaginosus* 560 and 574 provided by the Departmental collection of non-pathogenic microorganisms for agricultural purposes (All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg) were used as exopolysaccharide producers. In order to determine the influence of cultivation conditions on the synthesis of exopolysaccharides by *P. mucilaginosus*, the one-factor-at-a-time (OFAT) method was used. On the basis of the obtained results, we determined the most effective producer of exopolysaccharides, the age and dose of the inoculum, the optimal values of the cultivation temperature and medium pH, the source of nitrogen and its concentration, as well as the aeration conditions affecting exopolysaccharide biosynthesis and the growth of the selected bacterial strain *P. mucilaginosus*. It was established that the *P. mucilaginosus* 574 strain is the most effective producer of exopolysaccharides. It was shown that the biosynthesis of exopolysaccharides is most effective and economical upon the cultivation of *P. mucilaginosus* 574 on a nutrient medium containing 2% molasses without addition of minerals and nitrogen. The maximum amount of exopolysaccharides can reach 9.55 g/L on a nutrient medium containing 2% molasses at a volume of 50 ml with the addition of 0.1% corn extract as an inducer of exopolysaccharide synthesis at a cultivation temperature of 30 ± 1 °C, a medium pH of 6.0 ± 0.2 with the introduction of 5% inoculum after 24 hours of inoculation. The obtained research results are recommended for use when creating new technologies for the production of microbiological fertilizers.

Keywords: molasses, *Paenibacillus mucilaginosus*, exopolysaccharides, cultivation conditions

For citation: Ha TD, Kanarsky AV, Kanarskaya ZA, Scherbakov AV, Shcherbakova EN. Biosynthesis of exopolysaccharides by soil bacteria *Paenibacillus mucilaginosus* on a nutrient molasses medium. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):708–718. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-708-718>

ВВЕДЕНИЕ

На глазах современных людей происходит изменение климата, что приводит к глобальному потеплению и сопровождается снижением количества выпадающих осадков, и, соответственно, увеличивается площадь орошаемых посевных угодий [1]. Как правило, почвы, богатые množеством питательных веществ, имеют не благоприятную для растений структуру, плохо удерживают воду и питательные вещества, быстро высыхают, при этом питательные вещества в этих почвах находятся в недоступной форме для растения. Применение известных агротехнических методов обработки подобной почвы, в том числе орошение и внесение минеральных удобрений, не дает положительных результатов, является экономически неэффективным и даже экологически опасным.

В складывающейся ситуации использования сельскохозяйственных угодий в связи с необходимостью соблюдения экологической безопасности при воспроизводстве сельскохозяйственных культур для повышения плодородия и урожайности почвы все чаще вместо минеральных удобрений применяются бактериальные препараты, изготавливаемые на основе различных штаммов микроорганизмов или их метаболитов, известных как ризобактерии, способствующих росту растений (plant growth-promoting rhizobacteria – PGPR). Ризобактерии улучшают рост корней, тем самым повышают доступность микроэлементов к корням растений [2]. Кроме того, PGPR повышают

эффективность использования воды и увеличивают водопоглощающую способность корней в условиях дефицита воды [3].

Продукты метаболизма ризобактерий также влияют на физиологические процессы в растениях [4]. В частности, экзополисахариды (ЭПС), выделяемые бактериями, оказывают существенное влияние на различные свойства почвы и урожайность растений. Продуцентами ЭПС являются ризобактерии видов *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Paenibacillus* и др. [5–8]. ЭПС обладают уникальными влагоудерживающими и цементирующими свойствами, поэтому они играют жизненно важную роль в формировании и стабилизации почвенных агрегатов, регулировании питательных веществ и потока воды через корни растений [9, 10]. Более того, ЭПС обеспечивают усвоение питательных веществ растением и последующее увеличение роста растений. Отмечено, что ЭПС замедляют диффузию кислорода в клетку и, соответственно, защищают нитрогеназу в условиях кислородного стресса, а также участвуют во взаимодействии бактерий с растениями [11, 12]. Бактериальные ЭПС помогают снизить солевой стресс в растениях благодаря связыванию ионов Na^+ в корнях, при этом накопление в растениях ионов Na^+ уменьшается [13]. При внесении в почву бактерий, продуцирующих ЭПС, растения больше накапливают пролина, сахаров и свободных аминокислот в условиях дефицита воды [14]. Показано, что внесение в почву бактерий *Azospirillum*, синтезирующих

ЭПС, растения более устойчивы к водному стрессу благодаря улучшению структуры и благоприятному для растений агрегатному состоянию почвы [15].

Факторами, которые потенциально могут влиять на синтез ЭПС бактериями, являются состав питательной среды, особенно источники углерода и азота, а также такие параметры, как pH, температура и время инкубации.

Целью настоящей работы являлось определение эффективности биосинтеза ЭПС почвенными бактериями *P. mucilaginosus* при культивировании на питательной среде, приготовленной из мелассы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали штаммы бактерий *Paenibacillus mucilaginosus* 560 и 574, предоставленные Ведомственной коллекцией непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург).

Для определения перспективного штамма из взятых культур проводили глубинное культивирование обоих штаммов бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде Александрова следующего состава, %: меласса – 2; NaCl – 0,02; K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,05; $CaCO_3$ – 0,01 [16]. Питательную среду стерилизовали в автоклаве при температуре 120 ± 1 °C и избыточном давлении 1 атм в течение 20 мин. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера 250 мл объемом среды 100 мл при температуре 30 ± 1 °C и непрерывном перемешивании со скоростью 200 об./мин на шейкере инкубатора ES-20 в течение 3-х суток.

Для определения влияния условий культивирования (концентрации субстрата, pH среды, температуры, источника азота, его концентрации, возраста и дозы посевного материала, аэрации) на рост и продуктивность ЭПС, синтезируемых бактериями *P. mucilaginosus*, использовали метод «один фактор за один раз» (one-factor-at-a-time – OFAT). Метод основан на варьировании одного фактора в то время как другие переменные факторы фиксируются [17].

В качестве источника углерода использовали мелассу, содержание которой в питательной среде варьировалось от 1 до 4%. Для определения влияния pH среды проводили корректировку питательной среды, приготовленной из мелассы, гидроксидом калия от 6 до 9. При инкубировании варьировали температуру от 25 до 35 °C.

В качестве источника азота использовали неорганические вещества (NH_4NO_3 , $(NH_4)_2SO_4$), органические источники азота (дрожжевой экстракт, пептон, бетафин, кукурузный экстракт, карбамид), концентрация которых в питательной среде составляла 0,1%. Концентрация наилучшего источника азота в питательной среде варьировалась: 0,02; 0,1; 0,2; 0,3 и 0,4%. Контроль-

ный опыт проводили без внесения в среду азотсодержащих веществ.

Посевной материал готовили в колбах инкубированием в течение 12, 24, 36, 48 ч и задавали в дозах 2, 5, 7, 10%.

Для определения влияния аэрации в колбы вместимостью 250 мл задавали питательную среду начальным объемом 50, 100, 150 мл, что соответствует отношению объема воздуха к объему среды 4:1; 1,5:1; 0,67:1 соответственно.

Рост исследуемых бактерий оценивали по таким критериям, как удельная скорость роста, время генерации и выход биомассы и ЭПС, которые рассчитывали согласно методике, рекомендованной в работе [18]. Количество биомассы бактерий определяли гравиметрическим методом после высушивания на влагомере «МХ-50». Синтез ЭПС оценивали косвенно по значению вязкости культуральной жидкости, которая определялась на вискозиметре Vibro SV-10A. Количество ЭПС определяли гравиметрическим методом, для этого ЭПС выделяли и очищали осаждением трехкратным объемом изопропанола с дальнейшим центрифугированием и высушиванием.

В супернатанте после 72 ч глубинного культивирования бактерий *P. mucilaginosus* определяли активность β -фруктофуранозидазы методом, изложенным в работе [19]. Остаточное содержание редуцирующих веществ (РВ) в супернатанте определяли с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты после гидролиза не усвоенных бактериями углеводов концентрированной серной кислотой с соотношением 1:1, методика определения которого приведена в работе [20].

Эксперименты проводили в трех биологических и аналитических повторностях, полученные результаты статистически обрабатывались с использованием стандартного пакета программы Excel 2010 и программы Prism 7.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Экспериментально установлено, что самыми перспективными продуцентами с высоким выходом биомассы и ЭПС при культивировании на питательной среде, содержащей сахарозу, являлись штаммы бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 [21, 22]. Для получения более дешевой и эффективной питательной среды вместо коммерческих сахаров был выбран отход сахарного производства – меласса, как один из наиболее доступных, эффективных углеродных субстратов. Преимуществами мелассы являются ее низкая стоимость, простота хранения. Помимо значительной доли сахара в ней содержатся различные соли, микроэлементы, аминокислоты и витамины, которые обеспечивают рост микроорганизмов [23].

В таблице показано, что с сопоставимыми

Ростовые параметры, количество биомассы и ЭПС двух штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 при культивировании на питательной среде, содержащей 2% мелассы

Growth parameters, biomass and EPSs of two strains *P. mucilaginosus* 560 and *P. mucilaginosus* 574 when cultivated on nutrient medium containing 2% molasses

Показатель	<i>P. mucilaginosus</i> 560	<i>P. mucilaginosus</i> 574
Удельная скорость роста, ч ⁻¹	0,13±0,03	0,12±0,03
Время генерации, ч	5,37±1,33	5,84±1,60
Количество биомассы, г/л	0,85±0,02	1,71±0,03
Количество ЭПС, г/л	4,20±0,13	5,02±0,15
Активность β-фруктофуранозидазы, ед./мл	0,33±0,01	0,84±0,01

значениями времени генерации и удельной скорости роста количества биомассы и ЭПС, синтезируемых штаммом *P. mucilaginosus* 574, соответственно в 2 и 1,2 раза больше по сравнению с количеством биомассы и ЭПС, синтезируемых штаммом *P. mucilaginosus* 560. Это может быть связано со способностью синтеза продуцентом фермента β-фруктофуранозидазы, гидролизующей сахарозу в мелассе, и усвоением субстрата индивидуальными штаммами. Это подтверждается и более высокой активностью β-фруктофуранозидазы штамма *P. mucilaginosus* 574.

Следует отметить, что в первые 48 ч культивирования обоих рассматриваемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* происходит изменение pH среды в сторону подкисления среды из-за накопления органических кислот в ней. К концу культивирования штамма *P. mucilaginosus* 560 наблюдается незначительное повышение pH среды – от 5,7 до 6,0. При этом pH среды интенсивно поднимается – от 5,6 до 6,9 – при культивировании штамма *P. mucilaginosus* 574. Увеличение pH среды может быть обусловлено изменением состава органических и неорганических веществ, присутствующих в мелассе, которые ассимилируются бактериями, а также продуктами метаболизма, синтезируемыми этими бактериями при культивировании [23] (рис. 1).

Полученные результаты исследований показали, что штамм *P. mucilaginosus* 574 при культивировании на питательной среде из мелассы является более перспективным продуцентом ЭПС с высоким выходом биомассы.

Известно, что концентрация субстрата является одним из лимитирующих факторов роста микроорганизмов. В настоящем исследовании определялось влияние концентрации мелассы на рост и синтез ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574. На рис. 2, а показана зависимость удельной скорости роста штамма *P. mucilaginosus* 574 от концентрации мелассы в среде. Отмечено, что максимальная удельная скорость роста исследуемого штамма достигает $\mu_{\text{max}} = 0,12 \text{ ч}^{-1}$ при концентрации мелассы 1% и в дальнейшем незначительно снижается в рассматриваемом диапазоне концентрации мелассы.

Кроме того, отмечено, что с повышением содержания мелассы в среде количество биомассы увеличивается. Максимальное количество био-

массы достигало 4 г/л при культивировании штамма *P. mucilaginosus* 574 на питательной среде с 4% мелассы. Однако максимальное количество ЭПС (5,0 г/л), соответственно максимальная вязкость культуральной жидкости, наблюдалось при культивировании на среде с 2% мелассы. Содержание мелассы выше 2% в среде ингибирует синтез ЭПС (рис. 2, б). Полученные результаты сопоставимы с данными, приведенными в работах [24, 25], где установлено, что содержание 2% мелассы в питательной среде является оптимальным для синтеза ЭПС бактериями *Azotobacter* с получением 7,5 г/л ЭПС, *Bacillus subtilis* – с получением 4,86 г/л ЭПС.

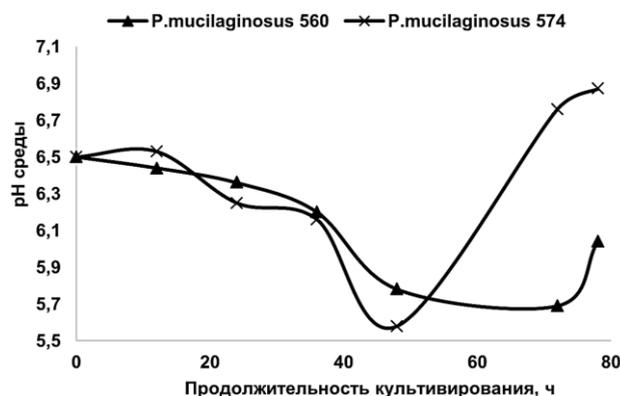


Рис. 1. Изменение pH среды при культивировании штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 на питательной среде с 2% мелассы при температуре $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ и непрерывном перемешивании со скоростью 200 об./мин на шейкере инкубатора ES-20 в течение 3 суток

Fig. 1. Medium pH change during cultivation of two strains of bacteria *P. mucilaginosus* 560 and 574 on nutrient medium with 2% molasses at temperature $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ and continuous stirring at speed of 200 rpm on incubator shaker ES-20 for 3 days

Определение влияния температуры на рост и синтез ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574 проводили на питательной среде с 2% мелассы. Температуру культивирования варьировали в диапазоне от 25 до 35 ° с интервалом 5 °.

Установлено, что оптимальной для синтеза ЭПС является температура 30 °C, на что указывает высокая вязкость культуральной жидкости.

Эта температура способствует и лучшему росту исследуемых бактерий. При повышении температуры культивирования до 35 °С происходит снижение синтеза биомассы в 2,3 раз, а ЭПС – в 8,6 раз по сравнению с оптимальной температурой культивирования 30 °С. Аналогично, при снижении температуры культивирования до 25 °С синтез биомассы уменьшается в 1,7 раз, ЭПС – в 1,9 раза по сравнению с оптимальной температурой культивирования (рис. 3, а).

Кроме температуры на рост и синтез ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574 также существенно влияет рН среды. Исследование проводилось при оптимальной температуре при корректировке рН среды с гидроксидом кальция от 6 до 9. В качестве контроля использовали питательную среду без корректировки рН среды со значением 6,0±0,2. Показано, что при рН = 9 рост рассмат-

риваемых штаммов не наблюдается. В диапазоне рН от 6 до 8 штамм *P. mucilaginosus* 574 эффективно растет при культивировании на питательной среде из мелассы при нейтральном значении рН = 7. Однако эффективный синтез ЭПС происходил под действием стрессовых факторов при изменении рН среды в более кислую или щелочную среду. В частности, максимальное количество ЭПС накапливалось в слабнокислой питательной среде при рН = 6 (рис. 3, б).

При оптимальных условиях культивирования ($T = 30\text{ °C}$, $\text{pH} = 6,0 \pm 0,2$) проводили определение влияния источника азота и его концентрации на рост и синтез ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574 (рис. 4). В качестве источников азота были выбраны как минеральные соли, так и органические вещества.

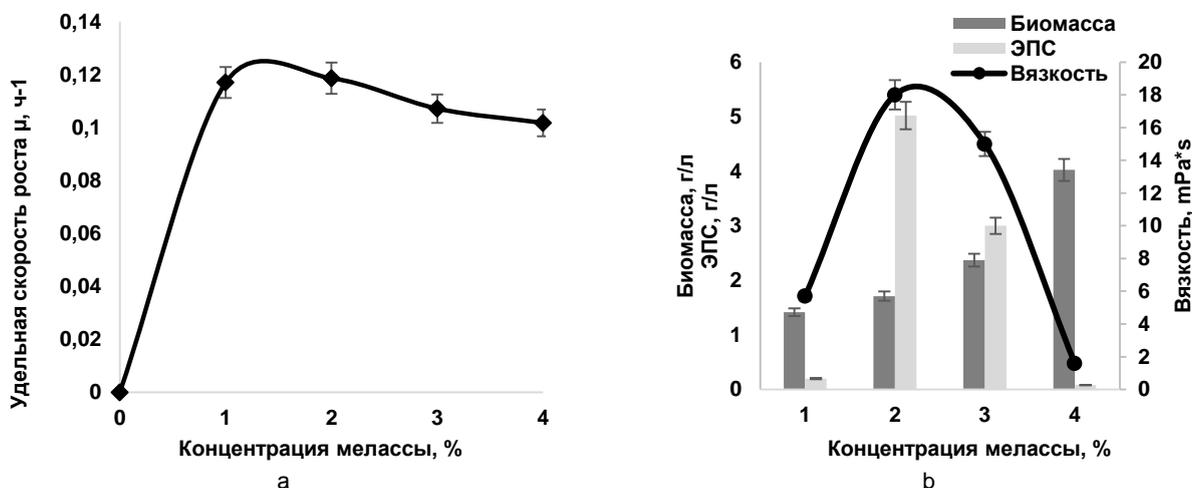


Рис. 2. Влияние концентрации мелассы в питательной среде на кинетику роста (а) и синтез продуктов метаболизма (б) штаммом 574 бактерий *P. mucilaginosus*

Fig. 2. Influence of molasses concentration in the nutrient medium on the growth kinetics (a) and the productivity of metabolic products (b) of strain *P. mucilaginosus* 574

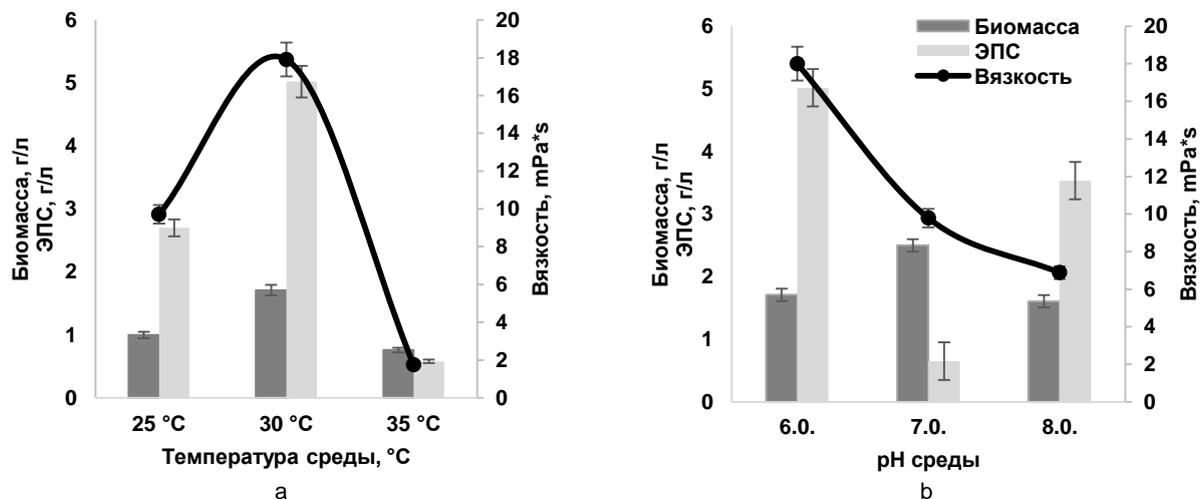


Рис. 3. Влияние температуры культивирования (а) и рН среды (б) на рост и синтез ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574

Fig. 3. Influence of the cultivation temperature (a) and medium pH (b) on the growth and synthesis of EPS by strain *P. mucilaginosus* 574

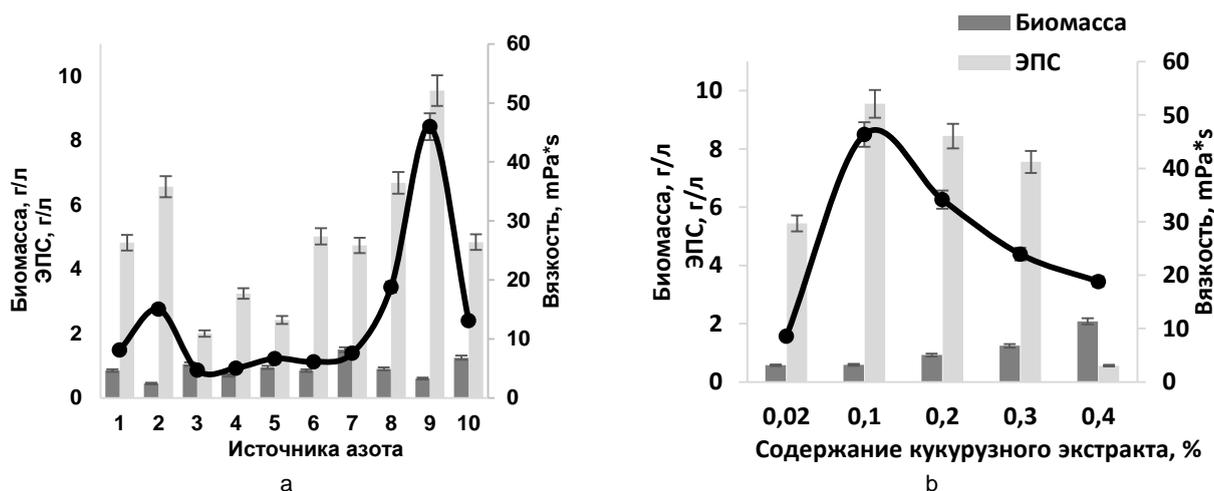


Рис. 4. Влияние источника азота (а) и его содержания (b) на синтез биомассы и ЭПС штамма *P. mucilaginosus* 574.
 На рис. 4, а: 1 – без источника азота; 2 – без источников минеральных солей и азота;
 3 – NH_4NO_3 ; 4 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5 – дрожжевой экстракт; 6 – одновременное присутствие $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и дрожжевого экстракта;
 7 – пептон; 8 – бетафин; 9 – кукурузный экстракт; 10 – карбамид

Fig. 4. Influence of the nitrogen sources (a) and its' concentration (b) on the biomass and EPS synthesis by strain 574 *P. mucilaginosus*. In fig. 4, a:

1 – without nitrogen sources; 2 – without mineral salts and nitrogen sources; 3 – NH_4NO_3 ; 4 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5 – yeast extract; 6 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and yeast extract mixture; 7 – peptone; 8 – betafin; 9 – corn extract; 10 – carbamide

Наблюдается интенсивность синтеза ЭПС рассматриваемым штаммом при культивировании на питательной среде, приготовленной из мелассы без дополнительных источников минеральных солей и азота (среда 2, рис. 4, а), поскольку в стрессовых условиях (при избытке сахарозы и недостаточном количестве азота) синтез ЭПС стимулируется. Следовательно, содержание питательных веществ в мелассе является достаточным для нормальной жизнедеятельности и синтеза ЭПС исследуемого штамма бактерии. Дополнительное внесение источника азота в питательную среду существенно влияет на рост исследуемого штамма бактерии по сравнению с контролем (среда 1, рис. 4, а). Наилучшим источником азота для синтеза биомассы служил пептон, который способствовал увеличению количества биомассы в 2 раза по сравнению с контролем (среда 1).

Из результатов, представленных на рис. 4, видно, что внесение в среду бетафина и кукурузного экстракта способствует синтезу ЭПС штаммом 574 *P. mucilaginosus*. Это, возможно, связано с содержанием в бетафине и кукурузном экстракте углеводов, которые стимулируют синтез ЭПС. Максимальная концентрация синтезируемых ЭПС достигала 9,55 г/л при внесении в среду кукурузного экстракта в количестве 0,1%, что в 2 раза больше по сравнению с контролем (см. среда 1, рис. 4, а) и в 1,5 раза больше при культивировании исследуемого штамма на среде, содержащей 2% мелассы и без дополнительных источников минеральных солей и азота (среда 2, рис. 4, а). По-видимому, это связано с содержа-

нием в кукурузном экстракте индукторов синтеза ЭПС. При дальнейшем повышении содержания кукурузного экстракта в среде создаются благоприятные условия для роста продуцента, в результате которого количество биомассы увеличивается, а синтез ЭПС снижается (рис. 4, b). Ранее также было установлено, что кукурузный экстракт является наиболее благоприятным источником азота для биосинтеза ЭПС бактериями *Bacillus megaterium* [26], дрожжами *Aureobasidium pullulans* RBF 4A3 [27] и грибами *Agaricus nevoi*, *Inonotus levis* HAI 796 и *Phellinus robustus* [28].

Исследовано влияние возраста и дозы инокулята на синтез биомассы и ЭПС рассматриваемого штамма (рис. 5). Установлено, что с увеличением возраста инокулята количество биомассы исследуемым штаммом повышается, при этом количество синтезируемых ЭПС снижается (рис. 5, а). Отмечено незаметное влияние дозы инокулята на синтез биомассы штаммом *P. mucilaginosus* 574. Максимальная концентрация ЭПС (9 г/л) и биомассы (0,4 г/л) наблюдалась при возрасте инокулята 24 ч (начальная лог-фаза, рис. 5, а) с внесением 5% инокулята (рис. 5, b).

При исследовании влияния аэрации на продуктивность штамма *P. mucilaginosus* 574 показано, что максимальное количество биомассы (2 г/л) и ЭПС (9,6 г/л), синтезируемых продуцентом *P. mucilaginosus* 574, наблюдается в условиях аэрации, при которых отношение объема воздуха к объему среды составляет 4:1 (рис. 6, а). Полученные результаты соответствуют результа-

там культивирования штаммом *Paenibacillus* sp. TKU023 [29]. Обнаружено, что в условиях интенсивной аэрации бактерии рода *Paenibacillus* быстро растут и синтезируют значительное количество метаболитов. При этом количество биомассы и ЭПС при соотношении объема воздуха к объему среды 4:1 соответственно в 2,6 и 6,6 раза больше по сравнению с соотношением объема воздуха к объему среды 1,5:1 и 0,67:1.

В связи с улучшением условий аэрации в среде рассматриваемый штамм может утилизи-

ровать до 96% углеводов мелассы. Ухудшение утилизации субстрата при снижении отношения объема воздуха к объему среды может быть связано с недостатком растворенного в среде кислорода или недостаточной аэрацией для полной утилизации углеводов мелассы. Вследствие полной утилизации сахара при соотношении объема воздуха к объему среды 4:1 число клеток достигает $6 \cdot 10^8$ КОЕ/мл и синтез ЭПС увеличивается до 9,55 г/л (рис. 6, b).

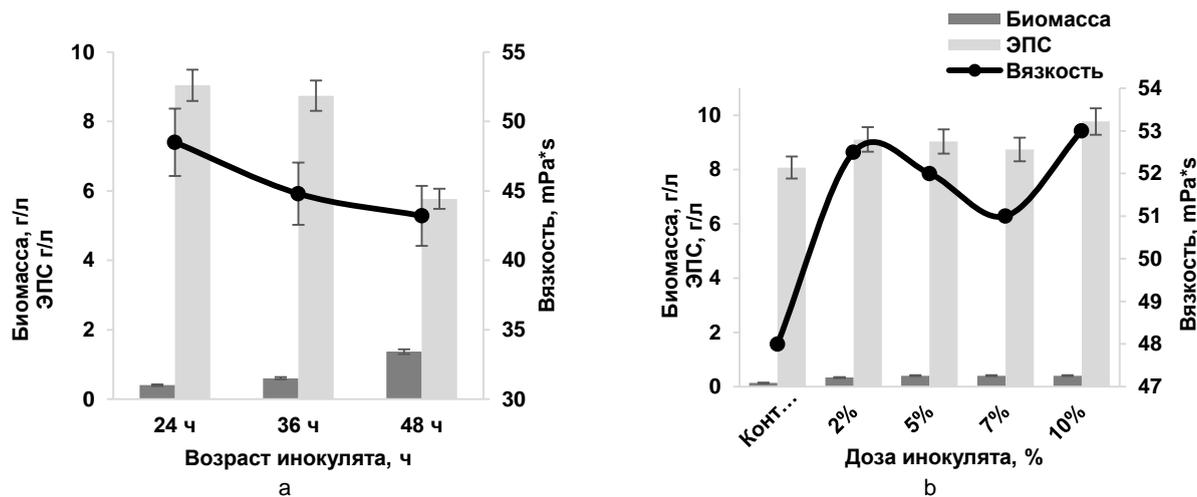


Рис. 5. Влияние возраста инокулята (а) и его дозы (b):
 1 – без инокулята (контроль); 2 – 2% инокулята; 3 – 5% инокулята; 4 – 7% инокулята;
 5 – 10% инокулята на синтез биомассы и ЭПС штамма *P. mucilaginosus* 574

Fig. 5. Influence of inoculum age (a) and inoculum dosage (b):
 1 – without inoculum; 2 – 2% inoculum; 3 – 5% inoculum; 4 – 7% inoculum;
 5 – 10% inoculum on the biomass and EPS synthesis of strain *P. mucilaginosus* 574

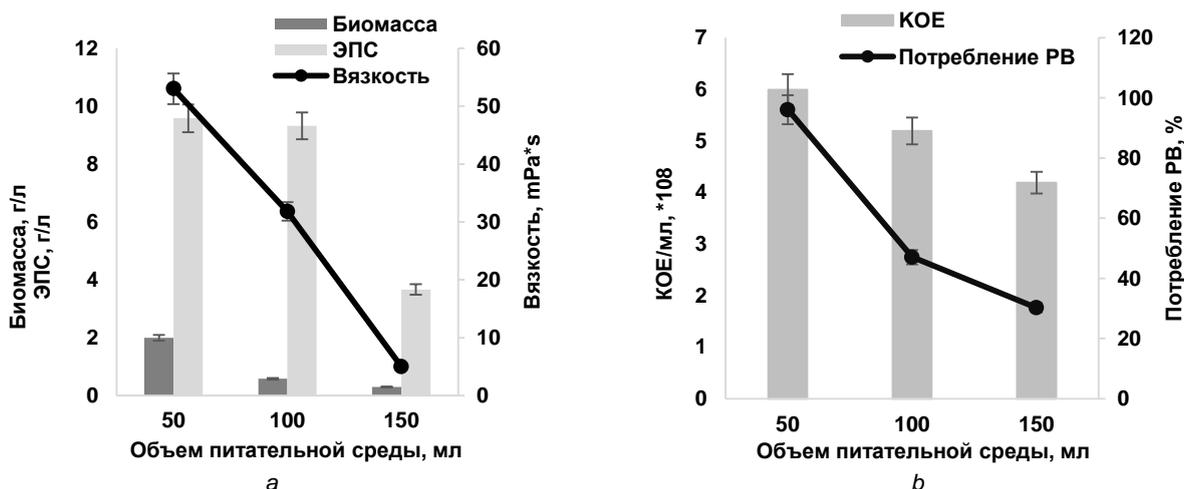


Рис. 6. Зависимость синтезируемых биомассы и ЭПС (а), числа колониеобразующих единиц и потребления субстрата РВ (b) штамма *P. mucilaginosus* 574 от отношения объема воздуха к объему среды

Fig. 6. Relationship between synthesized biomass and EPS (a), colony-forming units number and reducing sugars consumption (b) of strain *P. mucilaginosus* 574 and ratio of air volume with nutrient medium volume

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что эффективным продуцентом экзополисахаридов при культивировании на

питательной среде из мелассы является штамм *P. mucilaginosus* 574.

2. Показано, что эффективный синтез ЭПС

штаммом *P. mucilaginosus* 574 проходит на питательной среде из мелассы без дополнительного внесения минеральных веществ и азота. Это указывает на экономическую целесообразность использования мелассы без дополнительного внесения минеральных веществ и азота для культивирования *P. mucilaginosus* 574.

3. Выявлено, что для биосинтеза ЭПС культивирование штаммом *P. mucilaginosus* 574 целесообразно проводить на питательной среде, содержащей 2% мелассы при температуре куль-

тивирования 30 ± 1 °C и pH среды, равной $6,0 \pm 0,2$, с добавлением 0,1% кукурузного экстракта в качестве индуктора. Максимальная концентрация ЭПС, которая была получена с внесением 5% инокулята после 24 ч инокуляции при отношении объема воздуха к объему среды 4:1, составила 9,55 г/л.

Результаты проведенных исследований рекомендуют использовать при создании технологии производства микробиологических удобрений.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Khan N., Bano A., Rahman M.A., Rathinasapathi B., Babar M.A. UPLC-HRMS-based untargeted metabolic profiling reveals changes in chickpea (*Cicer arietinum*) metabolome following long-term drought stress // *Plant, Cell & Environment*. 2019. Vol. 42. Issue 1. P. 115–132. <https://doi.org/10.1111/pce.13195>
2. Vejan P., Abdullah R., Khadiran T., Ismail S., Boyce A.N. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review // *Molecules*. 2016. Vol. 21. Issue 5. P. 573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
3. Sade N., Gebretsadik M., Seligmann R., Schwartz A., Wallach R., Moshelion M. The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress // *Plant Physiology*. 2010. Vol. 152. Issue 1. P. 245–254. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145854>
4. Kloeppel J.W., Rodriguez-Kabana R., Zehnder A.W., Murphy J.F., Sikora E., Fernandez C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases // *Australasian Plant Pathology*. 1999. Vol. 28. Issue 1. P. 21–26. <https://doi.org/10.1071/AP99003>
5. Hilliou L., Freitas F., Oliveira R., Reis M.A.M., Lespineux D., Grandfils C., et al. Solution properties of an exopolysaccharide from a *Pseudomonas* strain obtained using glycerol as single carbon source // *Carbohydrate Polymers*. 2009. Vol. 78. Issue 3. P. 526–532. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.011>
6. Rottava I., Batesini G., Silva F.M., Lerin L., de Oliveira D., Padilha F.F., et al. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. // *Carbohydrate Polymers*. 2009. Vol. 77. Issue 1. P. 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.001>
7. Freitas F., Alves V.D., Pais J., Carvalheira M., Costa N., Oliveira R., et al. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol // *Process Biochemistry*. 2010. Vol. 45. Issue 3. P. 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.020>
8. Liang T.-W., Wang S.-L. Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: production, isolation, structure, and bioactivities // *Marine Drugs*. 2015. Vol. 13. Issue 4. P. 1847–1863. <https://doi.org/10.3390/md13041847>
9. Roberson E.B., Firestone M.K. Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp. // *Applied and Environmental Microbiology*. 1992. Vol. 58. Issue 4. P. 1284–1291. <https://doi.org/10.1128/AEM.58.4.1284-1291.1992>
10. Tisdall J.M., Oades J.M. Organic matter and water stable aggregates in soils // *European Journal of Soil Science*. 1982. Vol. 33. Issue 2. P. 141–163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1982.tb01755.x>
11. Sabra W., Zeng A.P., Lünsdorf H., Deckwer W.D. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase // *Applied and environmental microbiology*. 2000. Vol. 66. Issue 9. P. 4037–4044. <https://doi.org/10.1128/aem.66.9.4037-4044.2000>
12. Leigh J.A., Coplin D.L. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions // *Annual Review of Microbiology*. 1992. Vol. 46. P. 307–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.001515>
13. Ashraf M. Photosynthetic capacity and ion accumulation in a medicinal plant henbane (*Hyoscyamus niger* L.) under salt stress // *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2004. Vol. 78. Issue 2. P. 91–96.
14. Naseem H., Ahsan M., Shahid M.A., Khan N. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance // *Journal of Basic Microbiology*. 2018. Vol. 58. Issue 12. P. 1009–22. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800309>
15. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) // *Canadian Journal of Microbiology*. 2004. Vol. 50. Issue 8. P. 521–577. <https://doi.org/10.1139/W04-035>
16. Li X., Yang S.H., Yu X.C., Jin Z.X., Li W.D., Li L., et al. Construction of transgenic *Bacillus mucilaginosus* strain with improved phytase secretion // *Journal of Applied Microbiology*. 2005. Vol. 99. Issue 4. P. 878–884. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02683.x>
17. Czitrom V. One-factor-at-a-time versus designed experiments // *The American Statistician*. 1999. Vol. 53. Issue 2. P. 126–131. <https://doi.org/>

10.1080/00031305.1999.10474445

18. Maier R.M. Bacterial Growth. In: Maier R.M., Pepper I.I., Gerba C.P. Environmental Microbiology. San Diego, CA: Academic Press; 2000. Chapter 3. p. 43–60.

19. Barley M.J., Biely P., Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity // Journal of Biotechnology. 1992. Vol. 23. Issue 3. P. 257–270.

20. Морозова Ю.А., Скворцов Е.В., Алимова Ф.К., Канарский А.В. Биосинтез ксиланаз и целлюлаз грибами рода *Trichoderma* на послеспиртовой барде // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. N 19. С. 120–122.

21. Ха Т.З., Канарский А.В., Канарская З.А., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н. Эффективность культивирования бактерий рода *Paenibacillus mucilaginosus* на питательной среде на основе сахарозы // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. 2019. N 3. С. 62–72. <https://doi.org/10.17586/2310-1164-2019-12-3-62-72>

22. Ха Т.З., Канарская З.А., Канарский А.В., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н. Влияние источника углерода на синтез биомассы и экзополисахаридов бактериями *Paenibacillus mucilaginosus* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N 3. С. 509–518. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-509-518>

23. Яровенко В.Л., Маринченко В.А., Смирнов В.А., Устинников Б.А., Цыганков П.С., Швеи В.Н. [и др.]. Технология спирта. М.: Колос-Пресс, 2002. 464 с.

24. Emtiazia G., Ethemadifara Z., Habib M.H. Production of extra-cellular polymer in *Azotobacter* and biosorption of metal by exopolymer // African Journal of Biotechnology. 2004. Vol. 3. Issue 6. P. 330–333. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2060>

25. Razack S.A., Velayutham V., Thangavelu V. Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes // Turkish Journal of Biology. 2013. Vol. 3. Issue 37. P. 280–288. <https://doi.org/10.3906/biy-1206-50>

26. Chaijamrus S., Udpuay N. Production and Characterisation of Polyhydroxybutyrate from Molasses and Corn Steep Liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748. Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal. X p. 1–12, 2008.

27. Sharma N., Prasad G.S., Choudhury A.R. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide // Carbohydrate Polymers. 2013. Vol. 93. Issue 1. P. 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.059>

28. Elisashvili V.I., Kachlishvili E.T., Wasser S.P. Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production // Applied Biochemistry and Microbiology. 2009. Vol. 45. Issue 5. P. 531–535. <https://doi.org/10.1134/S0003683809050135>

29. Wang C.-L., Huang T.-H., Liang T.-W., Fang C.-Y., Wang S.-L. Production and characterization of exopolysaccharides and antioxidant from *Paenibacillus* sp. TKU023 // New Biotechnology. 2011. Vol. 28. Issue 6. P. 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.03.003>

REFERENCES

1. Khan N, Bano A, Rahman MA, Rathinasabapathi B, Babar MA. UPLC-HRMS-based untargeted metabolic profiling reveals changes in chickpea (*Cicer arietinum*) metabolome following long-term drought stress. *Plant, Cell & Environment*. 2019;42(1):115–132. <https://doi.org/10.1111/pce.13195>

2. Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Boyce AN. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review. *Molecules*. 2016;21(5):573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>

3. Sade N, Gebretsadik M, Seligmann R, Schwartz A, Wallach R, Moshelion M. The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress. *Plant Physiology*. 2010;152(1):245–254. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145854>

4. Kloeppel JW, Rodriguez-Kabana R, Zehnder AW, Murphy JF, Sikora E, Fernandez C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soil-borne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*. 1999;28(1):21–26. <https://doi.org/10.1071/AP99003>

5. Hilliou L, Freitas F, Oliveira R, Reis MAM, Lespineux D, Grandfils C, et al. Solution properties

of an exopolysaccharide from a *Pseudomonas* strain obtained using glycerol as single carbon source. *Carbohydrate Polymers*. 2009;78(3):526–532. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.011>

6. Rottava I, Batesini G, Silva FM, Lerin L, de Oliveira D, Padilha FF, et al. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. *Carbohydrate Polymers*. 2009;77(1):65–71. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.001>

7. Freitas F, Alves VD, Pais J, Carvalheira M, Costa N, Oliveira R, et al. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol. *Process Biochemistry*. 2010;45(3):297–305. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.020>

8. Liang T-W, Wang S-L. Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: production, isolation, structure, and bioactivities. *Marine Drugs*. 2015;13(4):1847–1863. <https://doi.org/10.3390/md13041847>

9. Roberson EB, Firestone MK. Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;58(4):1284–1291.

<https://doi.org/10.1128/AEM.58.4.1284-1291.1992>

10. Tisdall JM, Oades JM. Organic matter and water stable aggregates in soils. *European Journal of Soil Science*. 1982;33(2):141–163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1982.tb01755.x>

11. Sabra W, Zeng AP, Lünsdorf H, Deckwer WD. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(9):4037–4044. <https://doi.org/10.1128/aem.66.9.4037-4044.2000>

12. Leigh JA, Coplin DL. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Review of Microbiology*. 1992;46:307–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.001515>

13. Ashraf M. Photosynthetic capacity and ion accumulation in a medicinal plant henbane (*Hyoscyamus niger* L.) under salt stress. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2004;78(2):91–96.

14. Naseem H, Ahsan M, Shahid MA, Khan N. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *Journal of Basic Microbiology*. 2018;58(12):1009–22. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800309>

15. Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology*. 2004;50(8):521–577. <https://doi.org/10.1139/W04-035>

16. Li X, Yang SH, Yu XC, Jin ZX, Li WD, Li L, et al. Construction of transgenic *Bacillus mucilaginosus* strain with improved phytase secretion // *Journal of Applied Microbiology*. 2005. Vol. 99. Issue 4. P. 878–884. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02683.x>

17. Czitrom V. One-factor-at-a-time versus designed experiments. *The American Statistician*. 1999;53(2):126–131. <https://doi.org/10.1080/00031305.1999.10474445>

18. Maier RM. Bacterial Growth. In: Maier RM, Pepper II, Gerba CP. *Environmental Microbiology*. San Diego, CA: Academic Press; 2000. Chapter 3. p. 43–60.

19. Barley MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*. 1992;23(3):257–270.

20. Morozova YuA, Skvortsov EV, Alimova FK, Kanarsky AV. The biosynthesis of xylanases and cellulases by *Trichoderma* fungi on the post-alcohol bard. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of the Technological University*. 2012;15(19):120–122. (In Russian)

21. Ha DT, Kanarsky AV, Kanarskaya ZA,

Shcherbakov AV, Shcherbakova EN. The efficiency of *Paenibacillus mucilaginosus* bacteria cultivation on nutrient medium based on sucrose. *Nauchnyi zhurnal NIU ITMO. Seriya: Protsessy i apparaty pishchevykh proizvodstv = Scientific Journal NRU ITMO. Processes and Food Production Equipment*. 2019;3:62–72. (In Russian) <https://doi.org/10.17586/2310-1164-2019-12-3-62-72>

22. Ha DT, Kanarskaya ZA, Kanarsky AV, Shcherbakov AV, Shcherbakova EN. The effect of carbon source on the biomass and exopolysaccharide synthesis by *Paenibacillus mucilaginosus* bacteria. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(3):509–518. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-509-518>

23. Yarovenko VL, Marinchenko VA, Smirnov VA, Ustinnikov BA, Tsygankov PS, Shvets VN, et al. *Technology of alcohol*. Moscow: Kolos-Press; 2002. 464 p. (In Russian)

24. Emtiazia G, Ethemadifara Z, Habibib MH. Production of extra-cellular polymer in *Azotobacter* and biosorption of metal by exopolymer. *African Journal of Biotechnology*. 2004;3(6):330–333. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2060>

25. Razack SA, Velayutham V, Thangavelu V. Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. *Turkish Journal of Biology*. 2013;3(37):280–288. <https://doi.org/10.3906/biy-1206-50>

26. Chaijamrus S, Uduyay N. Production and Characterisation of Polyhydroxybutyrate from Molasses and Corn Steep Liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*. X p. 1–12, 2008.

27. Sharma N, Prasad GS, Choudhury AR. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. *Carbohydrate Polymers*. 2013;93(1):95–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.059>

28. Elisashvili VI, Kachlishvili ET, Wasser SP. Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009;45(5):531–535. <https://doi.org/10.1134/S0003683809050135>

29. Wang C-L, Huang T-H, Liang T-W, Fang C-Y, Wang S-L. Production and characterization of exopolysaccharides and antioxidant from *Paenibacillus* sp. TKU023. *New Biotechnology*. 2011;28(6):559–565. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.03.003>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ха Тхи Зунг,
аспирант кафедры пищевой биотехнологии,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Dung T. Ha,
Postgraduate Student,
Department of Food Biotechnology,
Kazan National Research Technological Univer-

420015, г. Казань, ул. Толстова, 8,
Российская Федерация,
e-mail: coldwind.91@mail.ru

Канарский Альберт Владимирович,
д.т.н., профессор кафедры пищевой
биотехнологии,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Толстова, 8,
Российская Федерация,
✉ e-mail: alb46@mail.ru

Канарская Зося Альбертовна,
к.т.н., доцент кафедры пищевой
биотехнологии,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Толстова, 8,
e-mail: zosya_kanarskaya@mail.ru

Щербаков Андрей Владимирович,
к.б.н., научный сотрудник лаборатории
технологии микробных препаратов,
Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
метеорологии,
196608, С.-Петербург, шоссе Подбельского, 3,
Российская Федерация,
e-mail: microbe-club@inbox.ru

Щербакова Елена Николаевна,
к.с.-х.н., младший научный сотрудник
лаборатории технологии микробных
препаратов,
Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
метеорологии,
196608, С.-Петербург, шоссе Подбельского, 3,
Российская Федерация,
e-mail: alonagonchar@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта ин-
тересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

*Статья поступила в редакцию 13.10.2020;
одобрена после рецензирования 18.11.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

sity,
8, Tolstov St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
e-mail: coldwind.91@mail.ru

Albert V. Kanarsky,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Department of Food Biotechnology,
Kazan National Research Technological
University,
8, Tolstov St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
✉ e-mail: alb46@mail.ru

Zosia A. Kanarskaya,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Department of Food Biotechnology,
Kazan National Research Technological
University,
8, Tolstov St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
e-mail: zosya_kanarskaya@mail.ru

Andrei V. Shcherbakov,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
laboratory of Microbial Technology,
All-Russia Research Institute for Agricultural
Microbiology,
3, Podbelsky Highway, St. Petersburg, 196608,
Russian Federation,
e-mail: microbe-club@inbox.ru

Elena N. Shcherbakova,
Cand. Sci. (Agriculture), Researcher,
laboratory of Microbial Technology,
All-Russia Research Institute for Agricultural
Microbiology,
3, Podbelsky Highway, St. Petersburg, 196608,
Russian Federation,
e-mail: alonagonchar@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

*All authors have read and approved the final
manuscript.*

*The article was submitted 13.10.2020;
approved after reviewing 18.11.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 579

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-719-727>



Исследование влияния нефти на биологическую активность черноземной почвы

© Е.Ю. Руденко

Самарский государственный технический университет, г. Самара, Российская Федерация

Резюме: Изучено воздействие нефти на микроорганизмы и ферментативную активность черноземной почвы. Исследования проводили на черноземе оподзоленном среднесуглинистом Самарской области, используя высокосернистую нефть средней плотности. На 1 кг почвы вносили 10,00 г (1%), 30,00 г (3%) или 50,00 г (5%) нефти. Результаты исследований показали, что среди аборигенной микробиоты почвы имеется большое разнообразие родов микроорганизмов, способных окислять и отдельные углеводороды, и сырую нефть в целом. Наибольшую активность при деградации как отдельных углеводородов, так и сырой нефти в целом проявили бактерии родов *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, мицелиальные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и дрожжи рода *Candida*. При свежем загрязнении нефтью наблюдалось повышение численности бактерий, использующих органические формы азота, актиномицетов, грибов, углеводородокисляющих микроорганизмов, также отмечена тенденция к увеличению численности автохтонных микроорганизмов, участвующих в минерализации гумусовых веществ. Через 3 месяца исследований было выявлено снижение численности бактерий, использующих органические формы азота, и актиномицетов; численность грибов больше всего снижается при внесении в почву 3 и 5% нефти, а численность автохтонных микроорганизмов, участвующих в минерализации гумусовых веществ, и углеводородокисляющих микроорганизмов возрастает при повышении степени нефтяного загрязнения. Угнетение различных групп микроорганизмов путем физического или токсического воздействия углеводородов сырой нефти может быть причиной снижения активности различных ферментов черноземной почвы. Углеводороды нефти подавляют активность полифенолоксидазы, каталазы, инвертазы, фосфатазы и липазы черноземной почвы, но незначительно стимулируют активность ее пероксидазы. Уменьшение коэффициента гумификации свидетельствует о преобладании процессов окисления гумусовых веществ над превращением органических соединений ароматического ряда в компоненты почвенного гумуса, а также об уменьшении плодородия почвы в результате ее загрязнения углеводородами сырой нефти.

Ключевые слова: черноземная почва, загрязнение, нефть, микроорганизмы, ферменты.

Для цитирования: Руденко Е.Ю. Исследование влияния нефти на биологическую активность черноземной почвы. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 4. С. 719–727. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-000-000>

Effects of crude oil on the biological activity of chernozem soils

Elena Yu. Rudenko

Samara State Technical University, Samara, Russian Federation

Abstract: The article investigates the effect of crude oil on soil microorganisms and the enzymatic activity of chernozem soils. Experiments were carried out on podzolized medium loamy chernozem in the Samara region using high-sulphur crude oil of medium density. Per 1 kg of soil, 10.00 g (1%), 30.00 g (3%) and 50.00 g (5%) of oil were applied. According to the obtained results, the native soil microbiota contains a wide variety of microorganisms capable of oxidizing both individual hydrocarbons and crude oil in general. Bacteria of the *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* and *Streptomyces* genera, filamentous fungi of the *Aspergillus* and *Penicillium* genera, as well as *Candida* yeast showed the greatest activity in the degradation of both individual hydrocarbons and crude oil in general. The soils freshly polluted with oil demonstrated an increase in the number of bacteria that consume organic forms of nitrogen, actinomycetes, fungi and hydrocarbon-oxidizing microorganisms. In addition, a growing trend in the number of autochthonous microorganisms participating in the mineralization of humic substances was observed. Following 3 months of experiments, a decrease in the number of bacteria consuming organic forms of nitrogen and actinomycetes was revealed. The number of fungi showed the most pronounced decrease upon addition of 3 and 5% of oil,

while the number of autochthonous microorganisms participating in the mineralization of humic substances and hydrocarbon-oxidizing microorganisms grew with an increase in the degree of oil pollution. Inhibition of various microorganisms by means of physical or toxic action of hydrocarbons contained in crude oil can cause a decrease in the activity of enzymes present in chernozem soils. Oil hydrocarbons inhibit the activity of polyphenol oxidase, catalase, invertase, phosphatase and lipase present in chernozem soils, although slightly stimulating the peroxidase activity. A decrease in the soil humification coefficient indicates that the oxidation of humic substances prevail over the decomposition of organic aromatic compounds into soil humus components, as well as a decrease in soil fertility as a result of its contamination with crude oil hydrocarbons.

Keywords: chernozem soils, pollution, oil, microorganisms, enzymes

For citation: Rudenko E.Yu. Effects of crude oil on the biological activity of chernozem soils. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):719–727. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-719-727>

ВВЕДЕНИЕ

Процессы добычи, транспортировки переработки нефти представляют серьезную опасность для окружающей среды в связи с большим количеством аварийных ситуаций, регулярно возникающих в этих отраслях хозяйственной деятельности человека. В местах загрязнения сырой нефтью или другими органическими загрязнителями наблюдается развитие микроорганизмов, способных к их окислению [1–5]. Процессы разложения углеводов в почвах протекают при участии ферментов, выделяемых микроорганизмами. Изменение микробиологической и ферментативной активности является одним из показателей воздействия углеводородов нефти на биогеоценоз почвы [6]. Изучение биологической активности необходимо для планирования и проведения ремидиационных мероприятий, направленных на восстановление плодородия почвы. Цель настоящего исследования – изучение воздействия нефти на микроорганизмы и ферментативную активность черноземной почвы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили на черноземной почве (рН водной вытяжки – $7,03 \pm 0,20$) Самарской области, используя высокосернистую нефть средней плотности (массовая доля серы 2,07%). В 1-й серии опытов на 1 кг почвы добавляли 10,00 г (1%) нефти, во 2-й серии – 30,00 г (3%), а в 3-й серии – 50,00 г (5%) и инкубировали в течение 3-х месяцев при температуре $30,0 \pm 1,0$ °С. Контролем служила почва, не загрязненная нефтью.

Анализ микробиологического состава биоценоза почвы и количественный учет различных фи-

зиологических групп микроорганизмов проводили на селективных питательных средах. Для выявления бактерий использовали питательный агар, актиномицетов – крахмало-аммиачный агар, грибов – агаризованное солодовое сусло, автохтонных микроорганизмов – почвенный агар^{1,2}, углеводородокисляющих микроорганизмов – агаризованную минеральную среду Маккланга³. На основании морфологических, культуральных, физиологических и биохимических свойств, определенных стандартными методами, принятыми в микробиологической практике^{1,2}, устанавливали родовую принадлежность выделенных штаммов микроорганизмов^{4,5} [7].

Способность углеводородокисляющих микроорганизмов использовать в качестве единственного источника углерода различные алканы, ароматические и полициклические ароматические углеводороды или углеводороды исследуемой сырой нефти в массовой концентрации 10,00 г/л (1%) исследовали на минеральной среде Маккланга³ после инкубирования в термостате в течение 7 суток при температуре $30,0 \pm 1,0$ °С. Рост микроорганизмов определяли визуально по наличию и интенсивности помутнения среды после инкубирования.

Способность утилизации нефти массовой концентрации 10,00 г/л (1%) чистыми культурами микроорганизмов, имеющими концентрацию белка 1,00 мг/л, исследовали на среде Маккланга после инкубации в течение 20 суток при температуре $30,0 \pm 1,0$ °С². Остаточное содержание углеводов и сырой нефти проводили методом колоночной хроматографии с УФ-спектрофотометрической детекцией⁶.

¹Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учеб. пособие; под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. СПб.: Лань, 2016. 588 с.

²Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студентов высших учебных заведений; под ред. А.И. Нетрусова. М.: ИЦ «Академия», 2005. 608 с.

³Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для вузов; 5-е изд., перераб. и доп. М.: Дрофа, 2004. 256 с.

⁴Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей: учеб. пособие. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2004. 221 с.

⁵Watanabe T. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species. Florida: CRC Press, 2002. 486 p.

⁶Другов Ю.С., Родин А.А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. Практическое руководство. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. 270 с.

Активности окислительно-восстановительных (каталазы, пероксидазы и полифенолоксидазы) и гидролитических (инвертазы, фосфатазы и липазы) ферментов почвы определяли титрометрическими и колориметрическими методами [8] через 0,5 и 3 мес. после начала опытов. Коэффициент гумификации вычисляли как отношение активности полифенолоксидазы к активности пероксидазы [9]. При расчете степени уменьшения коэффициента гумификации за 100% принимали коэффициент гумификации не загрязненной нефтью почвы через 0,5 мес. после начала опытов.

Эксперименты проводили в трехкратной повторности, исследования каждой пробы осуществляли также в трех повторностях. При обсуждении результатов учитывали статистически достоверные различия при $p < 0,05$. Математическую обработку результатов проводили с применением программы Statistica.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования показали, что среди аборигенной микробиоты черноземной среднесуглинистой почвы Самарской области имеется большое разнообразие родов микроорганизмов, способных окислять как отдельные углеводороды, так и сырую нефть в целом (таблица). n-Алканы наиболее активно способны окислять бактерии рода *Acinetobacter* и дрожжи рода *Candida*. Из всех изученных алканов подавляющее большинство микроорганизмов, выделенных из черноземной почвы, могут окислять

гексадекан. Меньше всего родов микроорганизмов способны утилизировать декан и ундекан. Самую высокую активность в утилизации ароматических и полициклических ароматических углеводородов проявляют бактерии родов *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* и мицелиальные грибы рода *Aspergillus*. Бактерии рода *Alcaligenes* способны утилизировать все изученные ароматические углеводороды, но из полициклических ароматических углеводородов они могут ассимилировать только нафталин. У бактерий рода *Chromobacterium* обнаружена способность использовать ароматические углеводороды, но не полициклические ароматические углеводороды. Мицелиальные грибы родов *Penicillium* и *Rhizoctonia* способны разлагать полициклические ароматические углеводороды, но не могут ассимилировать ароматические углеводороды.

Чистые культуры бактерий и грибов, выделенных из черноземной почвы, проявили высокую активность при деградации сырой нефти на среде Маккланга (рис. 1).

Аборигенные микроорганизмы черноземной среднесуглинистой почвы Самарской области показали высокую степень деградации нефти при инкубировании загрязненной почвы в течение трех месяцев в лабораторном опыте. При среднем уровне загрязнения почвы степень деградации нефти составила $57,76 \pm 1,73\%$, при высоком – $66,69 \pm 1,67\%$, а при очень высоком – $73,44 \pm 2,20\%$.

Микроорганизмы почвы, способные ассимилировать углеводороды
 Soil microorganisms capable to assimilate hydrocarbons

Группа микроорганизмов	Род микроорганизмов	Соединение массовой концентрации 10,00 г/л (1%)											Нефть	
		Алканы					АУ				ПАУ			
		Гексадекан	Гептан	Декан	Октан	Ундекан	Бензол	Ксилол	Толуол	Этилбензол	Антрацен	Нафталин		Фенантрен
Бактерии	<i>Acinetobacter</i>	±	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Alcaligenes</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Chromobacterium</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
	<i>Corynebacterium</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	±
	<i>Flavobacterium</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	±
	<i>Micrococcus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
	<i>Mycobacterium</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
Актиномицеты	<i>Streptomyces</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Мицелиальные грибы	<i>Aspergillus</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Mucor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
	<i>Penicillium</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	<i>Rhizoctonia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	±	±
	<i>Rhizopus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
	<i>Trichoderma</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
Дрожжи	<i>Candida</i>	+	-	+	±	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Rhodotorula</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Примечание. АУ – ароматические углеводороды; ПАУ – полициклические ароматические углеводороды; «+» – наличие роста; «-» – отсутствие роста, «±» – слабый рост.

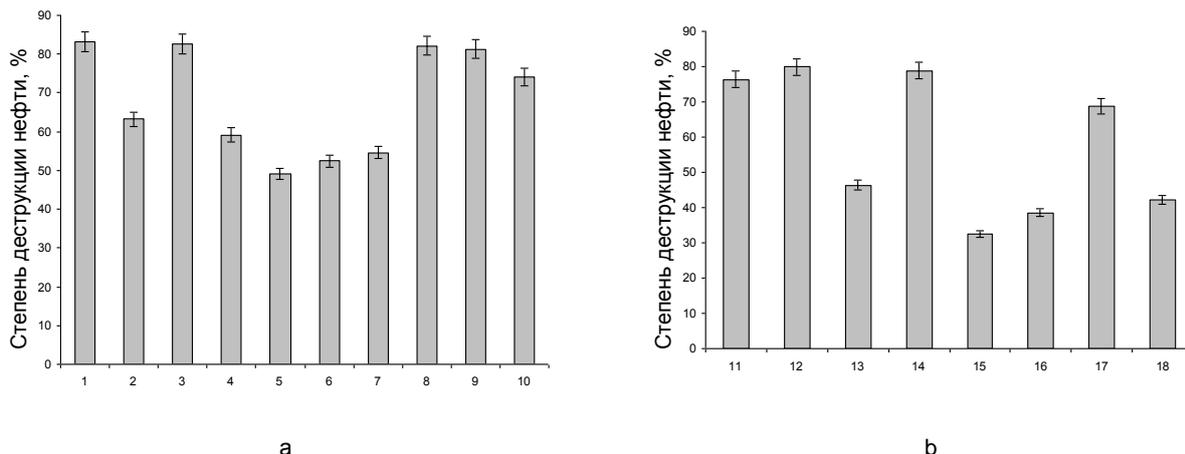


Рис. 1. Деградация нефти чистыми культурами бактерий (а) и грибов (б):

1 – *Acinetobacter*; 2 – *Alcaligenes*; 3 – *Bacillus*; 4 – *Chromobacterium*; 5 – *Corynebacterium*; 6 – *Flavobacterium*; 7 – *Micrococcus*; 8 – *Mycobacterium*; 9 – *Pseudomonas*; 10 – *Streptomyces*; 11 – *Aspergillus*; 12 – *Candida*; 13 – *Mucor*; 14 – *Penicillium*; 15 – *Rhizoctonia*; 16 – *Rhizopus*; 17 – *Rhodotorula*; 18 – *Trichoderma*

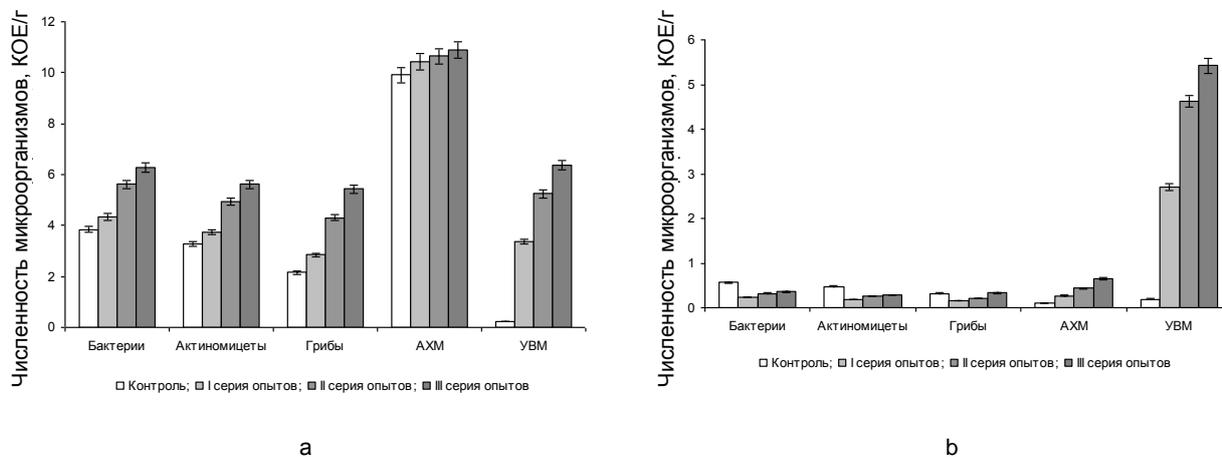
Fig. 1. Oil degradation by pure cultures of bacteria (a) and mushrooms (b):

1 – *Acinetobacter*; 2 – *Alcaligenes*; 3 – *Bacillus*; 4 – *Chromobacterium*; 5 – *Corynebacterium*; 6 – *Flavobacterium*; 7 – *Micrococcus*; 8 – *Mycobacterium*; 9 – *Pseudomonas*; 10 – *Streptomyces*; 11 – *Aspergillus*; 12 – *Candida*; 13 – *Mucor*; 14 – *Penicillium*; 15 – *Rhizoctonia*; 16 – *Rhizopus*; 17 – *Rhodotorula*; 18 – *Trichoderma*

При исследовании группового состава микроорганизмов по истечению 0,5-месячного периода при повышении степени нефтяного загрязнения наблюдалось повышение численности бактерий, использующих органические формы азота, актиномицетов, грибов, углеводородокисляющих микроорганизмов, также была отмечена тенденция к увеличению численности автохтонных микроорганизмов, участвующих в минерализации гумусовых веществ (рис. 2). Через 3 месяца исследований было выявлено снижение численности бактерий, использующих органические формы азота, и актиномицетов. Отмечено, что численность грибов больше всего снижается при среднем и высоком уровнях загрязнения почвы нефтью, а численность автохтонных микроорга-

низмов, участвующих в минерализации гумусовых веществ и углеводородокисляющих микроорганизмов, возрастает при повышении степени нефтяного загрязнения.

Загрязнение сырой нефтью оказывает негативное воздействие на ферментативную активность чернозема оподзоленного среднесуглинистого Самарской области. Под действием углеводородов уменьшается активность подавляющего большинства исследованных окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов почвы (рис. 3, 4). Обнаружено, что сырая нефть подавляет активность полифенолоксидазы, каталазы, инвертазы, фосфатазы и липазы, но незначительно стимулирует активность пероксидазы.



Примечание. Численность бактерий, актиномицетов и углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) $\cdot 10^6$; грибов – $\cdot 10^4$; автохтонных микроорганизмов (АХМ) – $\cdot 10^7$.

Рис. 2. Численность микроорганизмов черноземной почвы через 0,5 мес. (а) и 3 мес. (б) проведения опытов

Fig. 2. Microorganism number in chernozem soils after 0,5 months (a) and 3 months (b) carrying out of experiment

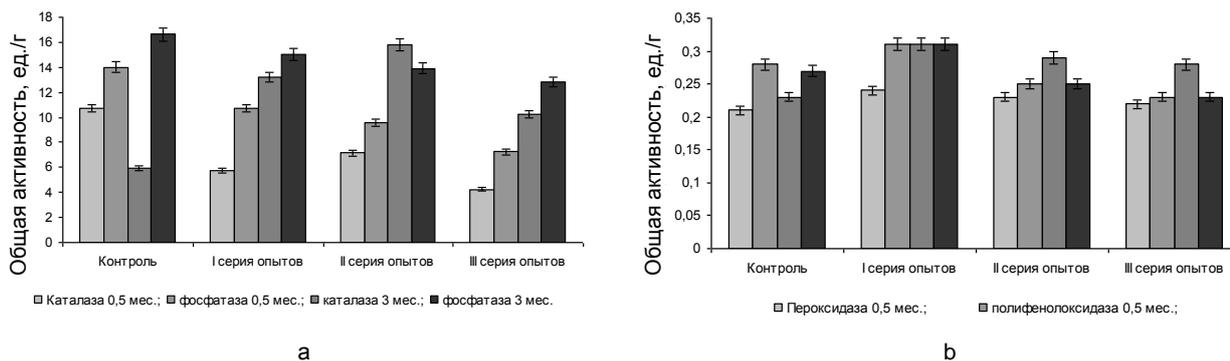


Рис. 3. Изменение активности каталазы и фосфатазы (а), пероксидазы и полифенолоксидазы (б) черноземной почвы при различных уровнях загрязнения нефтью

Fig. 3. Change in chernozem soil enzyme activity at various levels of oil contamination: catalase and phosphatase (a), peroxidase and polyphenol oxydase (b)

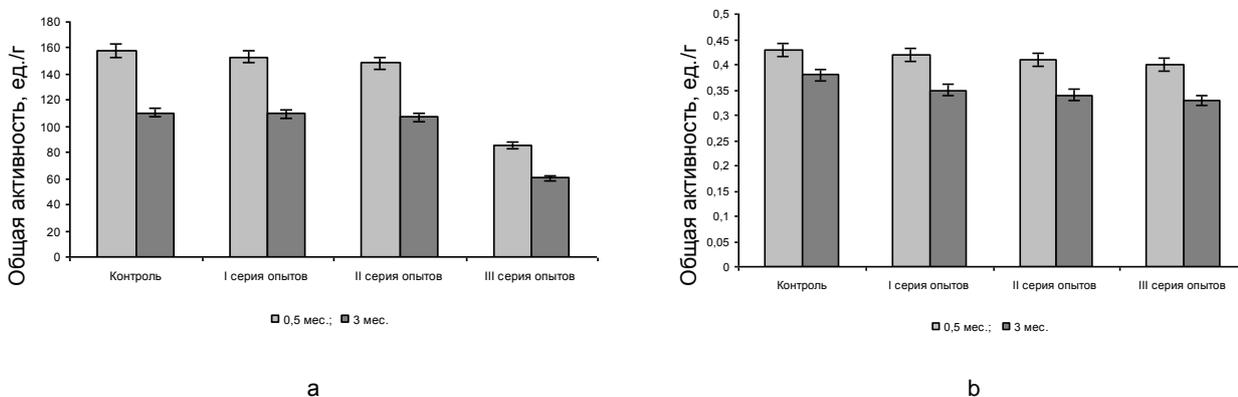


Рис. 4. Изменение активности инвертазы (а) и липазы (б) черноземной почвы при различных уровнях загрязнения нефтью

Fig. 4. Change of invertase (a) and lipase (b) activity in chernozem soils at various levels of oil contamination

Показатель активности пероксидазы позволяют судить об интенсивности протекания процессов окисления гумусовых веществ в почве, а при исследовании активности полифенолоксидазы можно оценить превращение органических соединений ароматического ряда в компоненты почвенного гумуса. Вычисление отношения активности полифенолоксидазы к активности пероксидазы позволяет рассчитать коэффициент гумификации (рис. 5), который дает возможность оценить преобладание катализируемых процессов.

Значительное снижение коэффициента гумификации черноземной почвы при загрязнении нефтью позволяет утверждать, что окисление гумусовых веществ преобладает над превращениями органических соединений ароматического ряда в компоненты почвенного гумуса, а также об уменьшении плодородия почвы в результате ее загрязнения углеводородами сырой нефти.

Многие исследователи отмечают различные изменения численности и видового состава аби-

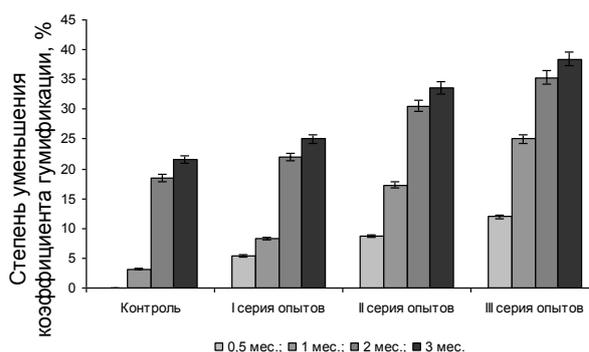


Рис. 5. Уменьшение коэффициента гумификации черноземной почвы

Fig. 5. Reduction of humification coefficient of chernozem soil

ригенных микроорганизмов почвы при ее загрязнении углеводородами, но не могут прийти к единому мнению относительно изменений структуры и численности биоценоза [1, 2, 10–13]. Однако в литературе отсутствует единая точка зре-

ния на то, каким образом изменяется структура и численность микробного сообщества почвы, т.к. одни авторы обнаруживают, что при увеличении доз нефти в почве возрастают общая численность бактерий, количество углеводородоокисляющих микроорганизмов и численность микромицетов, а численность актиномицетов постепенно снижается, другие исследователи показывают, что увеличивается доля бактерий, но снижается количество и разнообразие актиномицетов и грибов [14]. Такие расхождения данных возможны из-за влияния на численность микроорганизмов, помимо загрязнения, других факторов окружающей среды. Структура и численность сообщества микроорганизмов, разрушающих углеводороды, зависит от многих биотических и абиотических факторов, среди которых наиболее значимы концентрации загрязняющих веществ, способность микроорганизмов быстро и адекватно адаптироваться к изменившимся условиям их обитания и более раннего наличия в среде обитания подобных углеводородов [4, 15]. Увеличение численности углеводородоокисляющих микроорганизмов, автохтонных микроорганизмов, участвующих в минерализации гумусовых веществ, и микроскопических грибов может быть обусловлено присутствием субстратов, специфических для данных групп микроорганизмов, а также наличием у них ферментов, способных окислять углеводороды нефти [4].

Физическое и токсическое воздействие нефти на представителей аборигенной микробиоты приводит к изменениям в функционировании почвенных ферментов, подавляющее большинство которых выделяется в почву в результате жизнедеятельности различных микроорганизмов [5, 16]. Обнаружено, что углеводородное загрязнение почвы может вызвать как ингибирование, так и стимуляцию активности различных ее ферментов [17–20]. Некоторые исследователи полагают, что гидрофобные углеводороды почти не взаимодействуют с гидрофильными соединениями, в том числе с белками, поэтому в загрязненной нефтью почве активность ферментов не изменяется [21].

Угнетение различных групп микроорганизмов путем физического или токсического воздействия углеводородов сырой нефти может быть причиной снижения активности различных окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов черноземной почвы. Незначительное

повышение активности почвенной пероксидазы может быть обусловлено стимулированием развития аборигенных углеводородоокисляющих микроорганизмов, наблюдающимся при воздействии нефти на почву [20, 22].

В местах разливов сырой нефти или воздействия других органическими загрязнителями интенсивно развиваются бактерии, грибы или актиномицеты, способные к утилизации загрязняющих веществ [1], при этом изменяются закономерности существования и развития микробиоценоза почвы [23]. На начальных этапах воздействия нефти происходит угнетение различных показателей биологической активности почвы, продолжительность которого изменяется в зависимости от способа и интенсивности загрязнения углеводородами. Постепенно наблюдается восстановление нарушенных функций микробиоценоза почвы, которые проявляются в возрастании интенсивности дыхания, увеличении ферментативной активности, стимуляции развития микроорганизмов, что приводит к постепенному разложению контаминантов [22]. По мере уменьшения степени загрязнения почвы углеводородами нефти численность большинства групп микроорганизмов приближается к фоновым значениям, но численность углеводородоокисляющих бактерий достаточно долго остается более высокой, чем в незагрязненных нефтью почвах [1, 24], что может быть обусловлено изменением соотношения различных групп микроорганизмов, формирующих микробиоценоз почвы, под действием загрязняющих веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Черноземная среднесуглинистая почва Самарской области содержит большое разнообразие родов микроорганизмов, способных окислять алканы, ароматические углеводороды, полициклические ароматические углеводороды и нефть. Наибольшую активность при деградации как отдельных углеводородов, так и сырой нефти в целом проявляют бактерии родов *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, мицелиальные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и дрожжи рода *Candida*. Загрязнение сырой нефтью снижает активность окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов, а также уменьшает коэффициент гумификации черноземной среднесуглинистой почвы Самарской области.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Zamotaev I.V., Nikonova A.N., Ivanov I.V., Mikheev P.V. Chemical contamination and transformation of soils in hydrocarbon production regions // *Eurasian Soil Science*. 2015. Vol. 48. Issue 12. P. 1370–1382. <https://doi.org/10.7868/S0032180X1512014X>

2. Гасанова У.О. Воздействие нефтяного загрязнения на ферментативную активность и цел-

люлозоразлагающие микроорганизмы в серобурой почве // *Международный научно-исследовательский журнал*. 2019. N 3 (81). С. 52–58. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2019.81.3.007>

3. Киреева Н.А., Маркарова М.Ю., Щемелина Т.Н., Рафикова Г.Ф. Ферментативная и микробиологическая активность загрязненных нефтью глееподзолистых почв на разных стади-

ях из восстановления // Вестник Башкирского университета. 2006. Т. 11. N 4. С. 56–58.

4. Исакова Е.А. Особенности воздействия нефти и нефтепродуктов на почвенную биоту // Colloquium-journal. 2019. N 12 (36). С. 4–6. <https://doi.org/10.24411/2520-6990-2019-10325>

5. Бондарь П.Н., Леконцева И.В. Экологическая оценка состояния очищенной от нефтезагрязнений лесной почвы с применением микроорганизмов // Хвойные бореальной зоны. 2018. Т. 36. N 6. С. 568–573.

6. Margesin R. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils // International Biodeterioration and Biodegradation. 2000. Vol. 46. Issue 1. P. 3–10. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00049-4)

7. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1994. 816 p.

8. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии М.: Наука, 2005. 252 с.

9. Логинова О.О., Данг Т.Т., Белоусова Е.В., Грабович М.Ю. Использование штаммов рода *Acinetobacter* для биоремедиации нефтезагрязненных почв на территории Воронежской области // Вестник ВГУ, Серия: Химия, биология, фармация. 2011. N 2. С. 127–133.

10. Терещенко Н.Н., Лушников С.В., Митрофанова Н.А., Пилипенко С.В. Особенности биологической рекультивации нефтезагрязненных и техногенно засоленных почв // Экология и промышленность России. 2005. N 6. С. 33–36.

11. Peressutti S.R., Alvarez H.M., Pucci O.H. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil // International Biodeterioration and Biodegradation. 2003. Vol. 52. Issue 1. P. 21–30. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00102-6)

12. Пархоменко А.Н., Стогниева А.А. Использование микробиологических показателей для оценки состояния почв в условиях антропогенного воздействия // Вестник Оренбургского государственного университета. 2017. N 12 (212). С. 90–93.

13. Черных Н.А., Баева Ю.И. Изменение численности и видового состава бактерий в нефтезагрязненных почвах // Экологическая химия. 2018. Т. 27. N 5. С. 246–252.

14. Микроорганизмы и охрана почв / под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1989. 206 с.

15. Wolicka D., Suszek A., Borkowski A., Bielecka A. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products // Bioresource Technology. 2009. Vol. 100. Issue 13. P. 3221–3227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.020>

16. Kiss S., Dragan-Bularda M., Pasca D. Enzymology of the recultivation of technogenic soils // Advances in Agronomy. 1989. Vol. 42. P. 229–278. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60526-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60526-X)

17. Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities // Chemosphere. 2000. Vol. 40. Issue 4. P. 339–346. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00218-0)

18. Andreoni V., Cavalca L., Rao M.A., Nocerino G., Bernasconi S., Dell'Amico E., et al. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils // Chemosphere. 2004. Vol. 57. Issue 5. P. 401–412. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.013>

19. Emtiaz G., Abbasi S. Effect of DSO on microbial flora of soil // Isfahan University Research Journal. 2006. Vol. 74. P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2008.01.005>

20. Margesin R., Walder G., Schinner F. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil // Acta Biotechnologica. 2000. Vol. 20. Issue 3-4. P. 313–333. <https://doi.org/10.1002/abio.370200312>

21. Marin J.A., Hernandez T., Garcia C. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity // Environmental Research. 2005. Vol. 98. Issue 2. P. 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.06.005>

22. Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies // Bioresource Technology. 2000. Vol. 74. Issue 1. P. 63–67. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3)

23. Ruberto L., Vazquez S.C., Mac Cormack W.P. Effectiveness of the natural bacterial flora of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil // International Biodeterioration and Biodegradation. 2003. Vol. 52. Issue 2. P. 115–125. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00048-9](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00048-9)

24. Greene E.A., Kay J.G., Jaber K., Stehmeier L.G., Voordouw G. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons // Applied and Environmental Microbiology. 2000. Vol. 66. Issue 12. P. 5282–5289. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5282-5289.2000>

REFERENCES

1. Zamotaev IV, Nikonova AN, Ivanov IV, Mikhnev PV. Chemical contamination and transformation of soils in hydrocarbon production regions. *Eurasian Soil Science*. 2015;48(12):1370–1382. <https://doi.org/10.7868/S0032180X1512014X>

2. Gasanova UO. Influence of oil pollution on enzyme activity and cellulose-decomposing microorganisms in gray-drilled soil. *Mezhdunarodnyi*

nauchno-issledovatel'skii zhurnal = International Research Magazine. 2019;3:52–58. (In Russian) <https://doi.org/10.23670/IRJ.2019.81.3.007>

3. Kireeva NA, Markarova MY, Shchemelinina TN, Rafikova GF. Enzymatic and microbiological activity oil-contaminated northern soils at different stages of their restorations. *Vestnik Bashkirskogo universiteta = Bulletin of Bashkir University*. 2006;11

(4):56–58. (In Russian)

4. Isakova E.A. Features of influence of oil and oil products on soil biota. *Colloquium-journal*. 2019;12:4–6. (In Russian) <https://doi.org/10.24411/2520-6990-2019-10325>

5. Bondar PN, Lekonceva IV. Environmental assessment of the condition cleared from oil pollution of forest soil with application of microorganisms. *Khvoynye boreal'noi zony = Conifers of the boreal area*. 2018;36(6):568–573. (In Russian)

6. Margesin R. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2000;46(1):3–10. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00049-4)

7. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Co.; 1994. 816 p.

8. Khaziev FKh. *Methods of soil enzymology*. Moscow: Nauka; 2005. 252 p. (In Russian)

9. Loginova OO, Dang TT, Belousova EV, Grabovich MYu. Application of the strains of the genus *Acinetobacter* for bioremediations of oil-polluted soils on the Voronezh region territory. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2011;2:127–133. (In Russian)

10. Tereshchenko NN, Loushnikov SV, Mitrofanova NA, Peelipenko SV. The featured of biological restoration of oily and technogenically salted soils. *Ekologiya i promyshlennost' Rossii = Ecology and industry of Russia*. 2005;6:33–36. (In Russian)

11. Peressutti SR, Alvarez HM, Pucci OH. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2003;52(1):21–30. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00102-6)

12. Parkhomenko AN, Stognieva AA. Evaluation of the state of soils using microbiological indicators in the antropogenic impact. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Vestnik of the Orenburg State University*. 2017;12:90–93. (In Russian)

13. Chernykh NA, Baeva Yul. Changes in the number and species of bacteria in oil-polluted soils. *Ekologicheskaya khimiya*. 2018;27(5):246–252. (In Russian)

14. Zvyagintsev DG (ed.) *Microorganisms and preservation of bedrocks*. Moscow: Moscow State

University Publishing house; 1989. 206 p. (In Russian)

15. Wolicka D, Suszek A, Borkowski A, Bielecka A. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology*. 2009;100(13):3221–3227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.020>

16. Kiss S, Dragan-Bularda M, Pasca D. Enzymology of the recultivation of technogenic soils. *Advances in Agronomy*. 1989;42:229–278. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60526-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60526-X)

17. Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*. 2000;40(4):339–346. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00218-0)

18. Andreoni V, Cavalca L, Rao MA, Nocerino G, Bernasconi S, Dell'Amico E, et al. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere*. 2004;57(5):401–412. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.013>

19. Emtiazi G, Abbasi S. Effect of DSO on microbial flora of soil. *Isfahan University Research Journal*. 2006;74:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jpsep.2008.01.005>

20. Margesin R, Walder G, Schinner F. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. *Acta Biotechnologica*. 2000;20(3-4):313–333. <https://doi.org/10.1002/abio.370200312>

21. Marin JA, Hernandez T, Garcia C. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semi-arid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environmental Research*. 2005;98(2):185–195. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.06.005>

22. Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*. 2000;74(1):63–67. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3)

23. Ruberto L, Vazquez SC, Mac Cormack WP. Effectiveness of the natural bacterial flora of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2003;52(2):115–125. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00048-9](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00048-9)

24. Greene EA, Kay JG, Jaber K, Stehmeier LG, Voordouw G. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(12):5282–5289. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5282-5289.2000>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Руденко Елена Юрьевна,
д.б.н., доцент,
профессор кафедры технологии пищевых
производств и биотехнологии,
Самарский государственный технический
университет,

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Elena Yu. Rudenko,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Professor
of the Department of Technology of Alimentary
Productions and Biotechnology,
Samara State Technical University,
244, Molodogvardeyskaya St., Samara, 443100,

443100, г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244,
Российская Федерация,
✉ e-mail: e_rudenko@rambler.ru

Russian Federation,
✉ e-mail: e_rudenko@rambler.ru

Заявленный вклад автора

Руденко Е.Ю. выполнила экспериментальную работу, обобщила полученные результаты и написала рукопись. Автор имеет на статью исключительные авторские права и несет ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Автор прочел и одобрил окончательный вариант рукописи.

*Статья поступила в редакцию 01.10.2020;
одобрена после рецензирования 27.11.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

Contribution of the author

Elena Yu. Rudenko carried out the experimental work, analyzed the experimental results and prepared the text of the manuscript. Author has exclusive author's right and bear responsibility for plagiarism.

Conflict interests

The author declares no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by the author.

*The article was submitted 01.10.2020;
approved after reviewing 27.11.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*



Molecular weight characteristics and sorption properties of pectin extracted from different substrates

© Lyudmila L. Semenycheva, Nadezhda V. Kuleshova, Alexandr V. Mitin,
Tatiana A. Belaya, Darya V. Mochkina

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,
Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract: The study of natural polymers is one of the most advanced tasks of modern chemistry. One of these polymers is the common polysaccharide pectin. Widespread acid hydrolysis was used to extract pectin from various substrates. Oxalic, citric and hydrochloric acids have been investigated for this purpose. The water-soluble pectin-containing fraction was extracted from the apples, sugar beet, lemon peel, pine needles. The optimal condition is heating the substrate in a boiling water bath for 1 hour with reflux in a solution of hydrochloric acid (pH 2–3). We neutralized the extract after cooling with an ammonia solution to isolate the dry powder of the pectin-containing component and the pectin was precipitated with ethanol. The study of pectin solutions by the method of gel permeation chromatography showed that they most often have three polymer fractions that are close in molecular weights: ~17–20, ~10–12 and ~0.5 kDa. The content of the last fraction in all selected samples is predominant. Solutions of pre-planted powders of the pectin-containing fraction significantly differ from the previously discussed results: the oligomeric fraction is practically absent in them. For a number of samples of pectin powders, the degree of esterification was determined by potentiometric titration. The dependence of the degree of esterification on both the feedstock and the isolation method was revealed. The method of reverse complexometric titration was used to study the sorption capacity of pectin. The analysis results suggest that there is an inversely proportional dependence of the degree of lead sorption of the pectin sample on its degree of esterification.

Keywords: pectin-containing fraction, degree of esterification, molecular mass characteristics, sorption capacity

Acknowledgments: This work was carried out using the facilities of the New Materials and Resource Saving Technologies multi access centre in Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod.

For citation: Semenycheva LL, Kuleshova NV, Mitin AV, Belaya TA, Mochkina DV. Molecular weight characteristics and sorption properties of pectin extracted from different substrates. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):728–737. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-728-737>

УДК 542

Молекулярно-массовые характеристики и сорбционные свойства пектина, выделенного из разных субстратов

Л.Л. Семенычева, Н.В. Кулешова, А.В. Митин,
Т.А. Белая, Д.В. Мочкина

Нижегородский государственный университет им Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Российская Федерация

Резюме: Исследование природных полимеров является одной из передовых задач современной химии. Один из таких полимеров – полисахаридный пектин. Для его выделения из разных субстратов использовали широко распространенный кислотный гидролиз. Для этой цели исследованы щавелевая, лимонная и соляная кислоты. Водорастворимую пектинсодержащую фракцию выделяли из кожуры, ядрышек и жмыха яблок, жмыха сахарной свеклы, лимонной корки, хвои сосны. Оптимальным условием является нагревание субстрата на кипящей водяной бане в течение 1 ч с обратным холодильником в растворе соляной кислоты (pH = 2–3). Для выделения сухого порошка пектин-содержащего компонента экстракт после охлаждения нейтрализовали раствором аммиака и осадили пектин этанолом. Исследование растворов пектина методом гельпроницающей хроматографии показало, что они имеют чаще всего три полимерные фракции, близкие по значению молекулярных масс: ~17–20, ~10–12 и ~0,5 кДа. Содержание последней фракции во всех выделенных образцах было преимущественным. Растворы предварительно высаженных порошков

пектинсодержащей фракции заметно отличались от ранее обсужденных результатов: в них олигомерная фракция практически отсутствует. Для ряда образцов порошков пектина была определена степень этерификации методом потенциометрического титрования. Выявлена зависимость степени этерификации как от исходного сырья, так и от способа выделения. Для изучения сорбционной способности пектина, выделенного из разных субстратов, применяли метод обратного комплексонометрического титрования. Результаты анализа позволяют утверждать, что имеет место обратная пропорциональная зависимость степени сорбции свинца образца пектина от его степени этерификации.

Ключевые слова: пектинсодержащая фракция, степень этерификации, молекулярно-массовые характеристики, сорбционная способность

Благодарности: При выполнении данной работы использовано оборудование Центра коллективного пользования Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии».

Для цитирования: Семенычева Л.Л., Кулешова Н.В., Митин А.В., Белая Т.А., Мочкина Д.В. Молекулярно-массовые характеристики и сорбционные свойства пектина, выделенного из разных субстратов. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 4. С. 728–737. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-728-737>

INTRODUCTION

Natural polymers are currently the most widely used. Pectin is a water-soluble biologically active polymer and has universal properties: sorption, radioprotective properties, gelling ability. It has various applications in the food industry, medicine and animal husbandry due to its physicochemical and functional properties [1–8]. Pectin poly-saccharides are especially common in fruit and vegetable materials [8–11]. Publications devoted to the isolation of pectin from various substances are numerous, however, the methods of isolation, and, accordingly, the properties of the isolated products differ markedly [9, 11–16]. There are different approaches to the analysis of important properties of pectins, presented both in articles on experimental data and in reviews [5, 8, 17–22]. It has been shown that the hydrolysis time affects the change in the size and branching of polymers [20]. In addition, the strength of acid affects the chain length: the stronger the acid acts in hydrolysis, the lower the molecular weight of the resulting molecule. At pH = 1, the extracts are especially rich in rhamnogalacturonan, the nature and amount of side chains also differ depending on the extraction conditions [23]. Gelation is one of the most important characteristics of pectin. A number of factors—pH, presence of other solutes, molecular size, degree of methoxylation, number and arrangement of side chains, and charge density on the molecule — influence the gelation of pectin. In low-methoxyl pectin, gelation results from ionic linkage via calcium bridges between two carboxyl groups belonging to two different chains in close contact with each other. In high-methoxyl pectin, the cross-linking of pectin molecules involves a combination of hydrogen bonds and hydrophobic interactions between the molecules [24]. Recent research has demonstrated how cross-linking of pectic polysaccharides to obtain gel formation can be promoted by enzymatic catalysis reactions [25]. In general, the chemistry and mechanism of pectin-based crosslinking are well understood from the point of view of pharmacy, biology and ecolog-

gy. They are used as a immunostimulatory and anti-inflammatory drug [1, 26]. Even the bioactivity of pectin as antibiotics has been studied [27]. Crosslinked hydrogels have valuable properties such as volatility, swellability, solvability and hydrophilicity, which make them better alternative for wastewater treatment. The adsorption characteristics of pectin based hydrogels can be upgraded by using nanoparticles, which prompts to the development of hydrogel nanocomposites [2, 4, 7, 28].

The aim of this work is to obtain comparative data on a water-soluble pectin-containing fraction isolated by acid hydrolysis from various substances, by molecular weight parameters and sorption ability.

EXPERIMENTAL

Preparation of starting materials for the experiment. The raw materials were dried in a vacuum oven at a temperature of 45–50 °C, crushed, treated several times with acetone to remove essential oils, sugars, wax.

Methodology of extraction of the pectin-containing fraction from various substrates. Pectin was extracted from the feedstock with a solution of acid with pH 2–3 (hydrochloric, boric, oxalic, phosphoric, acetic) under heating in a boiling water bath in a flask under reflux for 1 hour. The hot extract was separated by filtration through nylon tissue. The filter residue was washed with hot water until the ions of the acid residue were negatively reacted.

Methodology for isolating the pectin-containing component from the solution by evaporation of the solvent. The extract was placed in a flask of rotary evaporators and evaporated for 2–3 hours at 800 °C under reduced pressure. Evaporation was continued to a volume of about 50–100 ml.

Methodology for isolating the pectin-containing component from the solution by reprecipitation. To isolate the dry powder of the pectin-containing component, the extract, after cooling, was neutralized

with an ammonia solution and pectin was precipitated with ethanol. The pectin isolated on a filter from kapron tissue was washed with alcohol and then dried to constant weight.

Analysis of molecular mass characteristics. The determination of MMD was performed by Gel permeation chromatography (GPC) in the center of collective use of equipment of Lobachevsky State University using a Shimadzu CTO20A/20AC high-performance liquid chromatograph (Japan) with LC-Solutions-GPC software module. Separation was performed on a Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWxl column with a pore diameter of 5 μm . An ELSD-LT II low-temperature light-scattering detector was used as a detector. An eluent was a 0.5 M solution of acetic acid. A flow rate of 0.8 ml/min. For calibration, finely dispersed dextran samples with a molecular weight range (MM) of 1000–410000 Da (Fluca) were used.

Method for determining the degree of esterification of pectin [10]. To determine the degree of esterification, a weighed portion of pectin 0.5 g of the powder was dissolved in water at a temperature of about 40 °C. The resulting solution was titrated potentiometrically with a 0.1 M sodium hydroxide solution. Mass fraction of ω_1 free carboxyl groups was calculated by the formula:

$$\omega_1, \% = \frac{V_1(\text{NaOH}) \times C(\text{NaOH})}{m} \cdot 0.45 \quad (1)$$

$V_1(\text{NaOH})$ – equivalent volume of alkali, ml; $C(\text{NaOH})$ – alkali concentration, mol/l; m – pectin weight, g; 0.45 – conversion factor for the mass of carboxyl groups.

Then, 10 ml of 0.5 M NaOH was added to the neutralized sample and kept at room temperature for hydrolysis of methoxylated carboxyl groups. After 2 hours, 10 ml of 0.5 M HCl was added to the sample and its excess was titrated potentiometrically. The mass fraction of esterified groups of ω_2 was calculated by the formula:

$$\omega_2, \% = \frac{V_2(\text{NaOH}) \times C(\text{NaOH})}{m} \cdot 0.45 \quad (2)$$

The degree of esterification was calculated by the formula:

$$Q = \frac{V_2}{V_1 + V_2} \cdot 100\% \quad (3)$$

Methodology for determining the sorption capacity (SC) of a pectin-containing fraction [10]. A weighed portion of pectin (0.3–0.5 g) was dissolved in distilled water, transferred to a 100–200 ml volumetric flask, 50 ml of a lead acetate solution with a concentration of 0.07 mol equivalents/l were added, and the volume was adjusted to the mark with distilled water. After an hour, the solution was filtered through a filter of nylon fabric. An aliquot of the filtrate (20 ml) was placed in a titration flask, 20 ml of

0.1 mol equivalents/l of complexon III solution, 15 ml of ammonia buffer solution (pH 10) and a few drops of the eriochrome black T indicator solution were added. It was titrated with 0.1 mol of zinc sulfate solution equivalents/l till the transition color. The control experiment was carried out similarly, but without the addition of pectin. The mass of lead ions remaining in the solution after sorption was calculated by the formula:

$$m(\text{Pb}^{2+}) = \frac{(C_1 V_1 - C_2 V_2) \times M(\text{Pb}^{2+}) \cdot V_k}{V_{al}} \quad (4)$$

C_1, V_1 – concentration (mol equivalents/l) and volume (ml) of complexon III solution added to an aliquot of lead pectin solution; C_2, V_2 – concentration (mol equivalents/l) and volume (ml) of zinc sulfate solution; $M(\text{Pb}^{2+})$ – molar mass of lead equivalent, g/mol; V_k, V_{al} – volume of volumetric flask and aliquot volume, ml.; $m(\text{Pb}^{2+})$ – mass of lead ions, mg.

The mass of lead ions in the control solution was calculated by a similar formula.

The sorption ability of pectin was calculated:

$$CC = \frac{m_k \text{Pb}^{2+} - m_p \text{Pb}^{2+}}{m(\text{pectin})}, \text{ mgPb}^{2+} / \text{g} \quad (5)$$

Methodology for sample preparation and analysis on a scanning microscope. The structure of the obtained pectin product was studied using a JSM-IT300 scanning electron microscope (JEOL Ltd., Japan). Samples of dehydrated pectin of lemon raw material were visualized. Dehydration of the samples occurred directly in the JSM-IT300 chamber under low vacuum.

RESULTS AND DISCUSSION

Widespread acid hydrolysis was used to isolate pectin from various substrates [8, 11, 18]. A water-soluble pectin-containing fraction was isolated from apples, sugar beets, lemon peel, pine needles.

Pectin is a high molecular weight polysaccharide. Therefore, we analyzed GPC of isolated pectin, sample of which are demonstrated at the Figure 1.

First of all, it was interesting to compare the molecular mass parameters of the isolated biopolymers, because in the literature, this information is given most often for individual substrates (apples, or citrus fruits, etc.), while the conditions for the isolation of pectin and determination methods differ. The data on the molecular mass parameters of the solutions obtained by GPC are shown in Table 1: No. 1–13 are the solutions after isolation from various substrates, No. 14, 15 – are the powder solutions, No. 16–18 are commercial pectins.

As can be seen from Table 1. the studied solutions of the isolated pectin-containing fraction (Table 1, No. 1–13) most often have three polymer fractions that are close in MM value: ~17–20, ~10–12 and ~0.5 kDa. The content of the last fraction in all selected samples is predominant. Obviously, this fraction of oligomers

has, as a rule, a high coefficient of polydispersity (1.5–5.7). A similar ratio of fractions and MM values

have commercial samples «Unipectin PG DS» and «Aidigo».

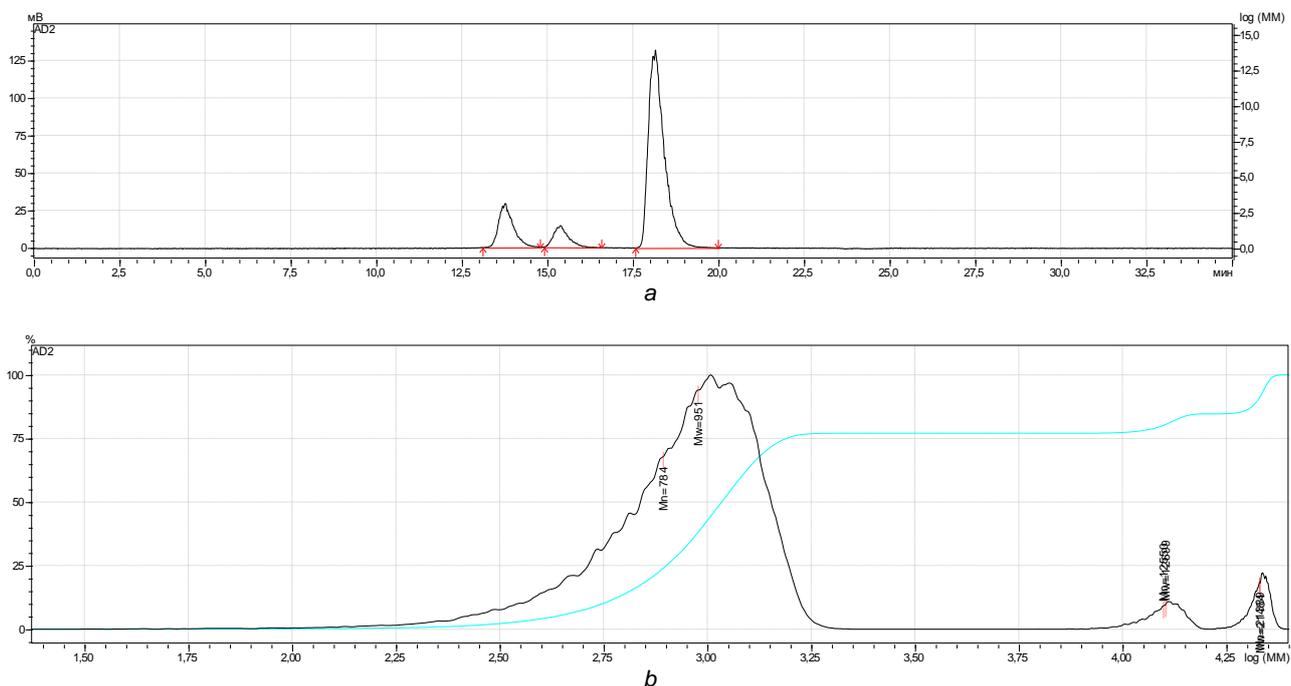


Fig. 1. GPC of sample No. 17 (see Table 1) “commercial apple pectin «Aidigo» (Russia)”:
 a – chromatogram type; b – type of molecular weight determination

Рис. 1. ГПХ образца № 17 (см. табл. 1) «коммерческий пектин «Айдиго» (Россия):
 а – вид хроматограммы; б – вид молекулярно-массового распределения

Table 1. Molecular mass characteristics of pectin extracted from the studied samples by various extractants

Таблица 1. Молекулярно-массовые характеристики пектина, выделенного из исследуемых образцов различными экстрагентами

Sample number	Conditions of extraction from sample	M_w , kDa	M_w/M_n	%
1	Sugar beet in the boric acid medium	17.5	1.0	4
		10.2	1.0	7
		0.5	1.5	89
2	Sugar beet in the oxalic acid medium	17.2	1.0	4
		8.2	1.1	12
		2.9	1.2	16
		0.4	5.7	68
3	Sugar beet in the acetic acid medium	17.5	1.0	9
		10.4	1.0	10
		0.4	2.9	80
4	Sugar beet in the phosphoric acid medium	16.3	1.0	8
		5.6	1.2	8
		0.5	5.2	83
5	Apple kernels in the boric acid medium	17.3	1.0	1
		9.7	1.1	1
		0.3	2.9	98
6	Apple peel in the boric acid in the medium	17.6	1.0	1
		10.3	1.0	1
		0.33	4.8	98
7	Apple peel in the acetic acid medium	17.5	1.0	1
		10.0	1.1	1
		0.35	2.9	98
8	Apple of variety «Bolotovskii» in the acetic acid medium	17.5	1.0	1
		10.0	1.0	1
		0.3	2.2	98
9	Apple of variety «Bolotovskii» in the boric acid medium	17.4	1.0	3
		9.8	1.0	1
		0.3	3.7	96

10	Apple of variety «Antonovka» in the acetic acid medium	17.6	1.0	1
		10.2	1.0	1
		0.35	4.1	98
11	Apple of variety «Antonovka» in the boric acid medium	17.7	1.0	0
		10.2	1.1	1
		0.34	6.3	99
12	Pine needles in the boric acid medium	21.0	1.0	6
		12.0	1.0	5
		0.4	3.7	89
13	Pine needles in the acetic acid medium	21.3	1.0	6
		12.4	1.0	5
		0.42	2.1	89
14	Pine needles in the acetic acid medium	21.0	1.0	81
		13.0	1.0	19
15	Lemon peels in the hydrochloric acid medium*	22.0	1.0	4
		12.7	1.0	90
		0.9	1.0	2
		0.2	1.2	5
16	Commercial citrus pectin «Unipectin PG DS» (Germany, France)	10.2	1.0	6
		0.4	3.8	94
17	Commercial Apple Pectin «Aidigo» (Russia)	21.0	1.0	15
		12.7	1.0	8
		0.95	1.2	77
18	Commercial Apple Pectin «Pudov» (Russia)	20.0	1.0	87
		12.5	1.0	13

*The solution is prepared from ethanol precipitated and dried pectin.

The solutions of pre-isolated powders of the pectin-containing fraction (Table 1. No. 14, 15) differ markedly from the previously discussed results: the oligomeric fraction is completely absent in sample 14, and is minimal in sample 15. Obviously, in this case the oligomeric fraction does not stand out in the form of powder but remains in the «solvent-precipitant» mixture, which is typical for the precipitation of any polymers [29]. The commercial sample «Pudov» has MM values close to these two samples.

Thus, the presented data on the analysis of the molecular mass parameters of the isolated pectin-containing fractions under comparable conditions indicate a significant similarity of these properties for all samples. There is an interesting fact that the conducted studies allow us to conclude with a high degree of probability that commercial samples «Unipectin PG DS» and «Aidigo» are obtained by evaporation of the solvent from the solution, while the oligomeric fraction is not lost. The commercial sample «Pudov» does not have an oligomeric fraction which means it was isolated by precipitation from a solution.

The sorption and gelling properties of pectin are associated with the degree of esterification of its monomer unit – polygalacturonic acid: pectin with a small degree of esterification has better sorption characteristics, and with a greater degree – better gelling properties. For a number of samples of pectin powders the degree of esterification was determined by potentiometric titration (Table. 2).

As it follows from the data obtained (Table 2) the degree of esterification depends on both the feedstock and the isolation method. Using an example of a sugar beet sample it can be seen that the reprecipitation of pectin leads to an increase in

the degree of esterification. The degree of esterification for the studied substrates obtained by evaporation of the extractant increases in the sequence «sugar beets» < «Antonovka apples», for the precipitated samples «sugar beets» < «lemon (fruit with thin peel)» < «lemon (fruit with thick peel)». The commercial samples «Pudov» are also close to the latest samples in this parameter.

Table 2. The degree of esterification of some types of pectin

Таблица 2. Степень этерификации некоторых видов пектина

Source substrate	Degree of esterification, %
Sugar beet ¹	13–15
Sugar beet ²	38–40
Lemon ² (fruit with a thin peel)	78–80
Lemon ² (fruit with a thick peel)	78–80
Apples («Antonovka») ¹	55–65
Commercial pectin «Pudov»	60–80

Note. ¹ – pectin obtained by evaporation of the solvent;

² – pectin obtained by isolation with ethanol after hydrolysis.

An important indicator of the quality of pectin used for the detoxification of metals is their sorption capacity (SC). This property is widely used in quality assessment in the production of medicines, flocculants, etc. This indicator corresponds to the mass of metal ions (mg of lead), which one gram of pectin can bind. The choice of lead is due to the fact that lead salts are the standard in the analysis of drugs for the content of heavy metals. To study the SC of pectin isolated from different substrates, the method of reverse complexometric titration was used. The results of the analysis are given in Table 3. Based on a comparison of the data of Table 2 (No. 1, 5) and Table 3 (No. 1, 2) it can be argued that there is an inversely proportional

dependence of the degree of sorption of lead by pectin samples on its degree of esterification.

Table 3. Sorption capacity of pectin isolated from various raw materials

Таблица 3. Сорбционная способность пектина, выделенного из разного сырья

Source substrate	Sorption capacity Pb ²⁺ mg/g
Sugar beet ¹	320–380
Apples («Antonovka») ¹	170–220
Pine needles	160–170

Note. ¹ – pectin obtained by evaporation of the solvent.

For a pectin sample isolated from a lemon peel by ethanol precipitation from an extract. the powder surface was studied by scanning electron microscopy. The fibrillar structure of the biopolymer is clearly visible. The resulting image is similar to those given

in the works of other authors [2, 7, 9, 16, 22, 30]. The structure of pectin is an object of research by various instrumental methods [6, 7, 20, 31, 32].

CONCLUSIONS

A pectin-containing fraction was extracted by acid hydrolysis from sugar beets, apples, lemon peel, pine needles. Content of three polymer fractions with close MM values: 17–20, 10–12 and ~0.5 kDa was determined using GPC. In solutions of pre-precipitated powders of the pectin-containing fraction the oligomeric fraction is practically absent. The dependence of the degree of esterification on both the feedstock and the isolation method was revealed. The inverse proportion of the degree of sorption of lead by pectin samples on the degree of its esterification has been established.

REFERENCE

1. Popov SV, Ovodov YS. Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins. *Biochemistry (Moscow)*. 2013;78(7):823–835. <https://doi.org/10.1134/S0006297913070134>
2. Zheng Y, Pierce A, Wagner WL, Scheller HV, Mohnen D, Tsuda A, et al. Analysis of pectin biopolymer phase states using acoustic emissions. *Carbohydrate Polymers*. 2020;227: 115282. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115282>
3. Marasini S, Yue H, Ho SL, Jung K-H, Park JA, Cha H, et al. d-Glucuronic acid-coated ultrasmall paramagnetic Ln₂O₃ (Ln = Tb, Dy, and Ho) nanoparticles: magnetic properties, water proton relaxivities, and fluorescence properties. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2019;2019(34):3832–3839. <https://doi.org/10.1002/ejic.201900378>
4. Sutar PB, Mishra RK, Pal K, Banthia AK. Development of pH sensitive polyacrylamide grafted pectin hydrogel for controlled drug delivery system. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008;19(6):2247–2253. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3162-y>
5. Pfaltzgraff LA, De Bruyn M, Cooper EC, Budarin V, Clark JH. Food waste biomass: A resource for high-value chemicals. *Green Chemistry*. 2013;15(2):307–314. <https://doi.org/10.1039/c2gc36978h>
6. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*. 2008;11(3):266–277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
7. Fares MM, Assaf SM, Abul-Hajja YM. Pectin grafted poly(N-vinylpyrrolidone): optimization and *in vitro* controllable theophylline drug release. *Journal of Applied Polymer Science*. 2009;117(4):1945–1954. <https://doi.org/10.1002/app.32172>
8. Wai WW, AlKarkhi AFM, Easa AM. Comparing biosorbent ability of modified citrus and durian rind pectin. *Carbohydrate Polymers*. 2010;79(3):584–589. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.09.018>
9. Dranca F, Vargas M, Oroian M. Physicochemical properties of pectin from *Malus domestica* 'Fälticeni' apple pomace as affected by non-conventional extraction techniques. *Food Hydrocolloids*. 2020;100:105383. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105383>
10. Kaisheva NSh, Shcherbak SN, Kompancev VA, Krikova NI, Ivanova LI. Analysis of protective pectin. *Zhurnal analiticheskoi khimii = Journal of Analytical Chemistry*. 1994;49(11):1158–1162. (In Russian)
11. Morales-Contreras BE, Wicker L, Rosas-Flores W, Contreras-Esquivel JC, Gallegos-Infante JA, Reyes-Jaqueza D, et al. Apple pomace from variety "Blanca de Asturias" as sustainable source of pectin: Composition, rheological, and thermal properties. *LWT – Food Science and Technology*. 2020;117:108641. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108641>
12. Sabater C, Sabater V, Olano A, Montilla A, Corzo N. Ultrasound-assisted extraction of pectin from artichoke by-products. An artificial neural network approach to pectin characterisation. *Food Hydrocolloids*. 2020;98:105238. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105238>
13. Wan L, Chen Q, Huang M, Liu FX, Pan SY. Physicochemical, rheological and emulsifying properties of low methoxyl pectin prepared by high hydrostatic pressure-assisted enzymatic, conventional enzymatic, and alkaline de-esterification: A comparison study. *Food Hydrocolloids*. 2019;93(2):146–155. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.022>
14. Maciel VB, Yoshida CMP, Boesch C, Goycoolea FM, Carvalho RA. Iron-rich chitosan-pectin colloidal microparticles laden with ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) extract. *Food Hydrocolloids*. 2020;98:105313. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105313>
15. Li DD, Yang N, Tao Y, Xu E-B, Jin Z-Y, Han Y-B, et al. Induced electric field intensification of acid hydrolysis of polysaccharides: Roles of thermal and non-thermal effects. *Food Hydrocolloids*. 2020;101: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105484>

16. Sengar AS, Rawson A, Muthiah M, Kalakandan SK. Comparison of different ultrasound assisted extraction techniques for pectin from tomato processing waste. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2020;61:104812. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104812>
17. Posé S, Kirby AR, Mercado JA, Morris VJ, Quesada MA. Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. *Carbohydrate Polymers*. 2012;88(3):882–890. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.029>
18. Khozhaenko E, Kovalev V, Podkorytova E, Khotimchenko M. Removal of the metal ions from aqueous solutions by nanoscaled low molecular pectin isolated from seagrass *Phyllospadix iwatensis*. *Science of the Total Environment*. 2015;565:913–921. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.108>
19. Fullmer CS, Edelstein S, Wasserman RH. Lead-binding properties of intestinal calcium-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1985;260(11):6816–6819.
20. Round AN, Rigby NM, MacDougall AJ, Morris VJ. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydrate Research*. 2010;345(4):487–497. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.12.019>
21. Antonov YA, Zhuravleva I, Celus M, Kyomugasho C, Lombardo S, Thielemans W, et al. Generality and specificity of the binding behaviour of lysozyme with pectin varying in local charge density and overall charge. *Food Hydrocolloids*. 2019;99:05–345. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105345>
22. Gu M, Fang H, Gao Y, Su T, Niu Y, Yu L(L). Characterization of enzymatic modified soluble dietary fiber from tomato peels with high release of lycopene. *Food Hydrocolloids*. 2019;99:105–321. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105321>
23. O'Donoghue EM, Somerfield SD. Biochemical and rheological properties of gelling pectic isolates from buttercup squash fruit. *Food Hydrocolloids*. 2008;22(7):1326–1336. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.07.002>
24. Levigne S, Ralet M-C, Thibault J-F. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers*. 2002;49(2):145–153. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00314-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00314-9)
25. Zaidel DNA, Meyer AS. Biocatalytic cross-linking of pectic polysaccharides for designed food functionality: Structures, mechanisms, and reactions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2012;1(3):207–219. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.03.007>
26. Thakur BR, Singh RK, Handa AK, Rao MA. Chemistry and uses of pectin – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1997;37(1):47–73. <https://doi.org/10.1080/10408399709527767>
27. Zofou D, Shu GL, Foba-Tendo J, Tabouguia MO, Assob J-CN. *In vitro* and *in vivo* anti-salmonella evaluation of pectin extracts and hydrolysates from 'cas mango' (*Spondias dulcis*). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2019;2019. Article ID 3578402. <https://doi.org/10.1155/2019/3578402>
28. Thakur S, Jyoti C, Vinod K, Thakur VK. Progress in pectin based hydrogels for water purification: Trends and challenges. *Journal of Environmental Management*. 2019;238:210–223. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.03.002>
29. Francuskiewicz F. *Polymer Fractionation*. Springer-Verlag Berlin; 1994. 217 p.
30. Xu M, Qi M, Goff HD, Cui SW. Polysaccharides from sunflower stalk pith: Chemical, structural and functional characterization. *Food Hydrocolloids*. 2020;100:105082. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.053>
31. Khotimchenko M, Makarova K, Khozhaenko E, Kovalev V. Lead-binding capacity of calcium pectates with different molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;97:526–535. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.065>
32. Khedmat L, Izadi A, Mofid V, Mojtahedi SY. Recent advances in extracting pectin by single and combined ultrasound techniques: A review of techno-functional and bioactive health-promoting aspects. *Carbohydrate Polymers*. 2020;229:115474. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115474>

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Popov S.V., Ovodov Y.S. Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins // *Biochemistry (Moscow)*. 2013. Vol. 78. Issue 7. P. 823–835. <https://doi.org/10.1134/S0006297913070134>
2. Zheng Y., Pierce A., Wagner W.L., Scheller H.V., Mohnen D., Tsuda A., et al. Analysis of pectin biopolymer phase states using acoustic emissions // *Carbohydrate Polymers*. 2020. Vol. 227. 115282. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115282>
3. Marasini S., Yue H., Ho S.L., Jung K.-H., Park J.A., Cha H., et al. d-Glucuronic acid-coated ultrasmall paramagnetic Ln₂O₃ (Ln = Tb, Dy, and Ho) nanoparticles: magnetic properties, water proton relaxivities, and fluorescence properties // *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2019. Vol. 2019. Issue 34. P. 3832–3839. <https://doi.org/10.1002/ejic.201900378>
4. Sutar P.B., Mishra R.K., Pal K., Banthia A.K. Development of pH sensitive polyacrylamide grafted pectin hydrogel for controlled drug delivery system // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008. Vol. 19. Issue 6. P. 2247–2253. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3162-y>
5. Pfaltzgraff L.A., De Bruyn M., Cooper E.C., Budarin V., Clark J.H. Food waste biomass: A resource for high-value chemicals // *Green Che-*

mistry. 2013. Vol. 15. Issue 2. P. 307–314. <https://doi.org/10.1039/c2gc36978h>

6. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis // *Current Opinion in Plant Biology*. 2008. Vol. 11. Issue 3. P. 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>

7. Fares M.M., Assaf S.M., Abul-Haija Y.M. Pectin grafted poly(N-vinylpyrrolidone): optimization and *in vitro* controllable theophylline drug release // *Journal of Applied Polymer Science*. 2009. Vol. 117. Issue 4. P. 1945–1954. <https://doi.org/10.1002/app32172>

8. Wai W.W., AlKarkhi A.F.M., Easa A.M. Comparing biosorbent ability of modified citrus and durian rind pectin // *Carbohydrate Polymers*. 2010. Vol. 79 Issue 3. P. 584–589. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.09.018>

9. Dranca F., Vargas M., Oroian M. Physicochemical properties of pectin from *Malus domestica* ‘Fälticeni’ apple pomace as affected by non-conventional extraction techniques // *Food Hydrocolloids*. 2020. Vol. 100. P. 105383. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105383>

10. Кайшева Н.Ш., Щербак С.Н., Компанцев В.А., Крикова Н.И., Иванова Л.И. Анализ пектинов защитного действия // *Журнал аналитической химии*. 1994. Т. 49. N 11. С. 1158–1162.

11. Morales-Contreras B.E. Wicker L., Rosas-Flores W., Contreras-Esquivel J.C., Gallegos-Infante J.A., Reyes-Jaqueza D., et al. Apple pomace from variety “Blanca de Asturias” as sustainable source of pectin: Composition, rheological, and thermal properties // *LWT – Food Science and Technology*. 2020. Vol. 117. P. 108641. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108641>

12. Sabater C., Sabater V., Olano A., Montilla A., Corzo N. Ultrasound-assisted extraction of pectin from artichoke by-products. An artificial neural network approach to pectin characterisation // *Food Hydrocolloids*. 2020. Vol. 98. P. 105238. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105238>

13. Wan L., Chen Q., Huang M., Liu F.X., Pan S.Y. Physicochemical, rheological and emulsifying properties of low methoxyl pectin prepared by high hydrostatic pressure-assisted enzymatic, conventional enzymatic, and alkaline de-esterification: A comparison study // *Food Hydrocolloids*. 2019. Vol. 93. Issue 2. P. 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.022>

14. Maciel V.B.V., Yoshida C.M.P., Boesch C., Goycoolea F.M., Carvalho R.A. Iron-rich chitosan-pectin colloidal microparticles laden with *ora-pro-nobis* (*Pereskia aculeata* Miller) extract // *Food Hydrocolloids*. 2020. Vol. 98. P. 105313. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105313>

15. Li D.D., Yang N., Tao Y., Xu E.-B., Jin Z.-Y., Han Y.-B., et al. Induced electric field intensification of acid hydrolysis of polysaccharides: Roles of thermal and non-thermal effects // *Food Hydrocolloids*. 2020. Vol. 101. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105484>

16. Sengar A.S., Rawson A., Muthiah M., Kalakandan S.K. Comparison of different ultrasound assisted extraction techniques for pectin from tomato processing waste // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2020. Vol. 61. P. 104812. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104812>

17. Posé S., Kirby A.R., Mercado J.A., Morris V.J., Quesada M.A. Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM // *Carbohydrate Polymers*. 2012. Vol. 88. Issue 3. P. 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.029>

18. Khozhaenko E., Kovalev V., Podkorytova E., Khotimchenko M. Removal of the metal ions from aqueous solutions by nanoscaled low molecular pectin isolated from seagrass *Phyllospadix iwatensis* // *Science of the Total Environment*. 2015. Vol. 565. P. 913–921. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.108>

19. Fullmer C.S., Edelstein S., Wasserman R.H. Lead-binding properties of intestinal calcium-binding proteins // *Journal of Biological Chemistry*. 1985. Vol. 260. Issue 11. P. 6816–6819.

20. Round A.N., Rigby N.M., MacDougall A.J., Morris V.J. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy // *Carbohydrate Research*. 2010. Vol. 345. Issue 4. P. 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.12.019>

21. Antonov Y.A., Zhuravleva I., Celus M., Kyomugasho C., Lombardo S., Thielemans W., et al. Generality and specificity of the binding behaviour of lysozyme with pectin varying in local charge density and overall charge // *Food Hydrocolloids*. 2019. Vol. 99. P. 105–345. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105345>

22. Gu M., Fang H., Gao Y., Su T., Niu Y., Yu L.(L.). Characterization of enzymatic modified soluble dietary fiber from tomato peels with high release of lycopene // *Food Hydrocolloids*. 2019. Vol. 99. P. 105–321. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105321>

23. O'Donoghue E.M., Somerfield S.D. Biochemical and rheological properties of gelling pectic isolates from buttercup squash fruit // *Food Hydrocolloids*. 2008. Vol. 22. Issue 7. P. 1326–1336. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.07.002>

24. Levigne S., Ralet M.-C., Thibault J.-F. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design // *Carbohydrate Polymers*. 2002. Vol. 49. Issue 2. P. 145–153. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00314-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00314-9)

25. Zaidel D.N.A., Meyer A.S. Biocatalytic cross-linking of pectic polysaccharides for designed food functionality: Structures, mechanisms, and reactions // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2012. Vol. 1. Issue 3. P. 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.03.007>

26. Thakur B.R., Singh R.K., Handa A.K., Rao M.A. Chemistry and uses of pectin – a review //

Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1997. Vol. 37. Issue 1. P. 47–73. <https://doi.org/10.1080/10408399709527767>

27. Zofou D., Shu G.L., Foba-Tendo J., Tabougua M.O., Assob J.-C.N. *In vitro* and *in vivo* anti-salmonella evaluation of pectin extracts and hydrolysates from 'cas mango' (*Spondias dulcis*) // Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2019. Vol. 2019. Article ID 3578402. <https://doi.org/10.1155/2019/3578402>

28. Thakur S., Jyoti C., Vinod K., Thakur V.K. Progress in pectin based hydrogels for water purification: Trends and challenges // Journal of Environmental Management. 2019. Vol. 238. P. 210–223. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.03.002>

29. Francuskiewicz F. Polymer Fractionation. Springer-Verlag Berlin, 1994. 217 p.

30. Xu M., Qi M., Goff H.D., Cui S.W. Poly-

saccharides from sunflower stalk pith: Chemical, structural and functional characterization // Food Hydrocolloids. 2020. Vol. 100. 105082. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.053>

31. Khotimchenko M., Makarova K., Khozhaenko E., Kovalev V. Lead-binding capacity of calcium pectates with different molecular weight // International Journal of Biological Macromolecules. 2017. Vol. 97. P. 526–535. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.065>

32. Khedmat L., Izadi A., Mofid V., Mojtahedi S.Y. Recent advances in extracting pectin by single and combined ultrasound techniques: A review of techno-functional and bioactive health-promoting aspects // Carbohydrate Polymers. 2020. Vol. 229. 115474. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115474>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Lyudmila L. Semenycheva,
Dr. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
Head of Research Laboratory,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave, Nizhny Novgorod, 603950,
Russian Federation,
✉ e-mail: llsem@yandex.ru

Nadezhda V. Kuleshova,
Cand. Sci. (Chemistry),
Associate Professor, Lecturer,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave, Nizhny Novgorod, 603950,
Russian Federation,
e-mail: nvku@yandex.ru

Alexandr V. Mitin
Cand. Sci. (Chemistry),
Head of Research Laboratory,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave, Nizhny Novgorod, 603950,
Russian Federation,
e-mail: ckr@ichem.unn.ru

Tatiana A. Belaya,
Master Student,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave, Nizhny Novgorod, 603950,
Russian Federation,
e-mail: kozina.tanya.t98@gmail.com

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Семеньева Людмила Леонидовна
д.х.н., старший научный сотрудник,
заведующая научно-
исследовательской лабораторией,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород,
пр-т Гагарина, 23,
Российская Федерация,
✉ e-mail: llsem@yandex.ru

Кулешова Надежда Вячеславовна,
к.х.н., доцент, преподаватель,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород,
пр-т Гагарина, 23,
Российская Федерация,
e-mail: nvku@yandex.ru

Митин Александр Вячеславович,
к.х.н., заведующий научно-
исследовательской лабораторией,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород,
пр-т Гагарина, 23,
Российская Федерация,
e-mail: ckr@ichem.unn.ru

Белая Татьяна Алексеевна,
магистрант,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород,
пр-т Гагарина, 23,
Российская Федерация,
e-mail: kozina.tanya.t98@gmail.com

Darya V. Mochkina,
Student,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave, Nizhny Novgorod, 603950,
Russian Federation,
e-mail: darya_mochkina@mail.ru

Мочкина Дарья Викторовна,
студентка,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород,
пр-т Гагарина, 23,
Российская Федерация,
e-mail: darya_mochkina@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта ин-
тересов.

*The final manuscript has been read and ap-
proved by all the co-authors.*

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*The article was submitted 30.10.2020;
approved after reviewing 28.11.2020;
accepted for publication 30.11.2020.*

*Статья поступила в редакцию 30.10.2020;
одобрена после рецензирования 28.11.2020;
принята к публикации 30.11.2020.*

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ ТОМА 10, 2020 г.

- А**
Абилова Г.А. N2 С. 274–284
Абрамов Н.В. N3 С. 496–506
Аверьянова Е.В. N2 С. 223–232
Агафонова С.В. N2 С. 314–325
Агеева Н.М. N2 С. 251–261
Адамович С.Н. N3 С. 487–496
Азимова Н.В. N2 С. 332–339
Айзина Ю.А. N4 С. 582–590
Алиев Э.Г. N1 С. 107–114
Алтынов А.А. N1 С. 114–124
Анциферов Е.А. N2 С. 205–213
Арефьева О.Д. N1, С. 21–29; N4 С. 603–612
Асламов А.А. N1 29–39; N4 С. 564–573
Асламова В.С. N1 С. 29–39; N4 С. 564–573
Аюрова О.Ж. N3 С. 376–386
- Б**
Бабадеев Д.В. N3 С. 386–393
Бабынин Э.В. N1 С. 48–56
Бадарин С.А. N3 С. 506–513
Бахарев В.В. N4 С. 613–626
Бахманова Ф.Н. N1 С. 107–114
Баяндин В.В. N1 С. 14–21; N3 С. 529–536
Белая Т.А. N4 С. 728–737
Беленева И.А. N4 С. 603–613
Белинская Н.С. N1 С. 114–124
Белозерова О.В. N3 С. 522–529
Белозерцева Н.Е. N1 С. 114–124
Бельков В.И. N4 С. 627–639
Бережная Е.В. N4 С. 657–666
Бибиков Д.Н. N3 С. 506–515
Бирюков А.П. N2 С. 251–261
Богданов И.А. N1 С. 114–124
Боженков Г.В. N2 С. 349–360
Боровский Г.Б. N2 С. 240–251
Бородин Д.Б. N3 С. 401–412
Буджурова У.М. N4 С. 647–657
Буланова С.А. N2 С. 339–349
Буханцев О.В. N4 С. 590–603
- В**
Валиулина Д.Ф. N1 С. 140–149
Вдовина Т.В. N4 С. 647–657
Везо О.С. N1 С. 63–77
Волков В.В. N2 С. 314–325
Волкова С.С. N1 С. 149–159
Ворожцов Д.Л. N2 С. 339–349
Воронов В.К. N4 С. 548–556
- Г**
Гавриков Д.Е. N2 С. 261–274
Гаврилова А.Ю. N3 С. 401–412
- Гаджиева С.Р.** N2 С. 196–205
Галка А.Г. N1 С. 56–63
Гамаюрова В.С. N3 С. 515–522
Гамидов С.З. N1 С. 107–114
Гарипова М.И. N4 С. 639–646
Гарник Е.Ю. N4 С. 627–638
Герасимов А.В. N1 С. 84–95
Гончарова А.М. N3 С. 450–459
Горбылева Е.Л. N2 С. 240–251
Готлиб Е.М. N4 С. 700–707
Грабельных В.А. N1 С. 29–39; N4 С. 564–573
Грабельных О.И. N4 С. 564–572
Григорьева Т.В. N1 С. 95–107
Громан А.А. N1 С. 149–159
Громова Д.А. N4 С. 678–690
Губанов, Н.Д. N2 С. 349–360
Гунич С.В. N1 С. 124–133
- Д**
Давлетшина Г.А. N3 С. 515–522
Дегтярева И.А. N1 С. 48–56
Дейнека В.И. N4 С. 691–699
Дейнека Л.А. N4 С. 691–699
Денисенко А.Н. N2 С. 339–349
Дергин А.А. N1 С. 6–14
Джавадова О.Н. N2 С. 332–339
До В.Т. N1 С. 159–169
Дорофеев Н.В. N4 С. 657–666
Дриль А.А. N4 С. 666–678
Дударев В.И. N1 С. 133–140
Дударева Г.Н. N1 С. 133–140
Дударева О.В. N4 С. 548–556
- Е**
Егоршина А.А. N1 С. 39–48
Емельянов А.И. N3 С. 536–540
Еремеева Н.Б. N1 С. 140–149; N4 С. 613–627
Ефременко З.А. N2 С. 261–274
- Ж**
Жамсаранжапова Т.Д. N2 С. 360–367
Жамсаранова С.Д. N1 С. 84–95
- З**
Забалуева Ю.Ю. N1 С. 84–95
Загурская Ю.В. N3 С. 470–479
Закарчевский С.А. N2 С. 360–367
Замбулаева Н.Д. N1 С. 84–95
Захарова С.С. N2 С. 240–251
Земнухова Л.А. N4 С. 603–613
Зиганшин Д.Д. N1 С. 39–48
Зинина О.С. N3 С. 506–515

- И**
Игнатова Д.Ф. N4 C. 613–627
Ильина О.В. N3 C. 376–386
Иринчинова Н.В. N1 C. 133–140
Искандаров А.Ю. N2 C. 180–188
Ищенко А.А. N2 C. 294–303
- К**
Кабанов В.Л. N4 C. 590–603
Калинкин Д.А. N4 C. 691–700
Канарская З.А. N3 C. 459–470; N4 C. 708–718
Канарский А.В. N3 C. 459–470; N4 C. 708–718
Канева Е.В. N1 C. 6–14
Киргина М.В. N1 C. 114–124
Кирюхина А.С. N3 C. 487–496
Китаевская С.В. N3 C. 439–450
Коваленко В.В. N3 C. 522–529
Ковехова А.В. N1 C. 21–29
Кольцов И.Н. N1 C. 149–159
Комарова Л.Ф. N2 C. 213–223
Комиссаров А.В. N3 C. 506–515
Константинов Ю.М. N4 C. 627–639
Коржова С.А. N1 C. 169–173; N3 C. 536–540
Коровкина Г.И. N3 C. 506–515
Коростелев А.В. N3 C. 479–487
Корсукова А.В. N4 C. 657–666
Костров А.В. N1 C. 56–63
Костылева Н.И. N3 C. 506–515
Коцупий О.В. N3 C. 470–479
Краснова С.Ю. N1 C. 56–63
Крыжко А.В. N4 C. 647–656
Крюкова П.С. N2 C. 189–196
Кузакова О.В. N3 C. 450–459
Кузнецова Н.П. N1 C. 169–173
Кулешова Н.В. N4 C. 728–737
Кулшреста В. N2 C. 360–367
Кульков В.Н. N1 C. 77–84
Кунавина Е.А. N2 C. 180–188
Куталова А.В. N2 C. 213–223
Кучменко Т.А. N3 C. 479–487
- Л**
Ларина Н.С. N3 C. 496–506
Литвинова М.А. N3 C. 376–386
Лозовая Т.С. N3 C. 487–496
Ломоватская Л.А. N3 C. 450–459
Лукиянов Н.Д. N3 C. 529–536
Лукиянцев М.А. N1 C. 39–48
- М**
Макаров С.С. N2 C. 360–367; N3 C. 529–536
Макарова Н.В. N1 C. 140–149; N4 C. 613–627
Мамедов И.Г. N2 C. 332–339
Мамонтова С.Г. N1 C. 6–14
Марданова В.И. N2 C. 196–205
- Мартусевич А.К. N1 C. 56–63
Матвеев Ю.И. N2 C. 223–232
Медведев Д.В. N2 C. 349–360
Мезенова Н.Ю. N2 C. 314–325
Мезенова О.Я. N2 C. 314–325
Минаев Н.В. N3 C. 529–536
Миневич И.Э. N4 C. 678–691
Мироненко В.В. N2 C. 205–213
Митин А.В. N4 C. 728–737
Могнонов Д.М. N3 C. 376–386
Мотина Т.Ю. N1 C. 48–56
Мочкина Д.В. N4 C. 728–737
Муравьев А.С. N3 C. 479–487
Муста Оглы Н.М. N2 C. 232–240
- Н**
Нгуен Ч.Т. N1 C. 159–169
Недвецкая Г.Б. N4 C. 582–590
Непомнящих А.И. N1 C. 6–14
Нечипоренко А.П. N1 C. 63–77; N4 C. 678–691
Нечипоренко У.Ю. N1 C. 63–77; N4 C. 590–603
Никифоров А.К. N3 C. 506–515
Новикова И.В. N3 C. 479–487
Нуриева О.А. N1 C. 149–159
- О**
Оборина Е.Н. N3 C. 487–496
Овчинникова М.В. N3 C. 506–515
Омеличкина Ю.В. N3 C. 424–439
- П**
Павлов И.Н. N2 C. 303–314
Павлова А.Г. N3 C. 412–424
Павловская Н.Е. N3 C. 401–412
Панасенко А.Е. N4 C. 603–613
Паничева Л.П. N1 C. 149–159
Перфильева А.И. N3 C. 412–424
Пешков С.А. N2 C. 180–188
Пироговская П.Д. N1 C. 21–29
Плотников И.А. N3 C. 506–515
Плотникова А.С. N4 C. 582–590
Плотникова Л.В. N1 C. 63–77
Подгорбунская Т.А. N1 C. 14–21; N3 C. 529–536
Пожидаев Ю.Н. N2 C. 360–367
Польнская М.М. N2 C. 205–213
Польнский И.В. N2 C. 205–213
Попов С.А. N2 C. 240–251
Пранович А.В. N3 C. 459–470
Привалова Е.А. N3 C. 487–496
Приставка А.А. N2 C. 261–274
Прозорова Г.Ф. N1 C. 169–173; N3 C. 536–540
Пырко А.Н. N4 C. 556–564
Пятрикас Д.В. N2 C. 240–251

- Р**
Рабинович Г.Ю. N2 С. 284–303
Решетник О.А. N3 С. 439–450
Розенцвейг И.Б. N3 С. 487–496
Романенко А.С. N3 С. 450–459
Руденко Е.Ю. N4 С. 719–727
Рудякова Е.В. N2 С. 349–360
Рукавицын П.В. N3 С. 479–487
- С**
Саламатов В.И. N2 С. 325–332
Саласина Я.Ю. N4 С. 691–699
Саловарова В.П. N2 С. 261–274
Сапожников А.Н. N4 С. 666–677
Семенычева Л.Л. N2 С. 339–349; N 4 С. 728–737
Серых В.Ю. N4 С. 582–590
Сибирцев В.С. N4 С. 590–602
Сидоров А.В. N2 С. 294–303
Сидоровская Е.А. N1 С. 149–159
Синицына Н.В. N3 С. 506–515
Сироткин А.С. N1 С. 39–48
Ситникова В.Е. N4 С. 678–690
Смирнова Ю.Д. N2 С. 284–294
Соловьева А.Г. N1 С. 56–63
Солопанов Е.Ю. N1 С. 77–84
Сомин В.А. N2 С. 213–223
Сорокин А.А. N2 С. 339–349
Сотникова Ю.М. N4 С. 639–646
Строганова Е.А. N3 С. 386–393
Султанов М.И. N1 С. 48–56
Сынгеева Э.В. N1 С. 84–95
Сысоева Е.В. N1 С. 95–107
Сысоева М.А. N1 С. 95–107
- Т**
Танганов Б.Б. N3 С. 393–401
Тарасенко В.И. N4 С. 627–638
Тахирли Ш.А. N2 С. 196–205
Тихонова А.Н. N2 С. 251–261
Третьяков Н.Ю. N1 С. 149–159
Турнаева Е.А. N1 С. 149–159
- У**
Умарханов Р.У. N3 С. 479–487
Уразлина Л.Н. N1 С. 95–107
Урумов А.С. N1 С. 14–21
Успенская М.В. N4 С. 678–690
Уфимцев В.И. N3 С. 470–479
- Ф**
Фарион И.А. N3 С. 376–386
Фархутдинов Р.Г. N4 С. 639–646
Федосеева В.Г. N3 С. 487–496
Федотова О.А. N4 С. 657–665
- Федяев В.В.** N4 С. 639–646
Федяева А.В. N2 С. 240–251
Филинова Н.В. N2 С. 294–303
Фомичева Н.В. N2 С. 284–294
Фунтикова Е.А. N4 С. 548–556
- Х**
Ха Т.З. N3 С. 459–470; N4 С. 708–718
Хабибрахманова В.Р. N1 С. 95–107
Харченко У.В. N4 С. 603–612
Хахинов В.В. N3 С. 376–385
- Ц**
Цивилева О.М. N3 С. 412–424
- Ч**
Чашина Е.Р. N2 С. 261–274
Черепанов И.С. N2 С. 188–196; N4 С. 573–581
Чеснокова А.Н. N2 С. 360–367
Чикишев Д.В. N3 С. 496–506
Чырагов Ф.М. N1 С. 107–114; N2 С. 196–205
- Шаглаева Н.С.** N1 С. 14–21; N3 С. 529–536
Шакирова Э.В. N3 С. 522–529
Шалунц Л.В. N1 С. 29–39; N4 С. 564–573
Шарова Н.Ю. N2 С. 232–240
Шафикова Т.Н. N3 С. 424–439
Шерстобитов С.В. N3 С. 496–506
Шпатов А.В. N2 С. 240–251
- Щ**
Щербаков А.В. N3 С. 459–470; N4 С. 708–718
Щербаков Г.Ю. N1 С. 149–159
Щербакова Е.Н. N3 С. 459–470; N4 С. 708–718
- Я**
Яковлева А.А. N1 С. 159–169
Ямалеева Е.С. N4 С. 700–707
Янчуковская Е.В. N1 С. 124–133

Уважаемые читатели!

Приглашаем Вас к активному творческому сотрудничеству по научным направлениям:

- Химические науки
- Физико-химическая биология
- Химическая технология

Журнал «Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология» включен в перечень рецензируемых научных изданий (**Перечень ВАК**) и следующие базы данных: Web of Science (**ESCI**), Chemical Abstracts Service (**CAS**), **EBSCO** Publishing Databases, European Reference Index for the Humanities and the Social Sciences (**ERIH PLUS**), **ВИНИТИ РАН**, система Российского индекса научного цитирования, представлен в электронной библиотеке «**Cyberleninka**», Directory of Open Access Journals (**DOAJ**) и описан в **Ulrich's Periodicals Directory**.

Публикациям журнала присваивается **DOI (Digital object identifier)**.

Редколлегия

Dear readers!

We would like to invite you to creative cooperation in the fields:

- Chemical Sciences
- Physical-Chemical and General Biology
- Chemical Technology

The Journal «Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya» is included in the list of journals which are regarded as academic publications by the State Commission for Academic Degrees and Titles (**ВАК**). The Journal also is indexing in Web of Science (**ESCI**), Chemical Abstracts Service (**CAS**), **EBSCO** Publishing Databases, European Reference Index for the Humanities and the Social Sciences (**ERIH PLUS**), **VINITI** Database (Referativnyi Zhurnal), Russian Science Citation Index, included in the digital scientific library **Cyberleninka**, Directory of Open Access Journals (**DOAJ**) and is described in **Ulrich's Periodicals Directory**.

Publications are assigned a **DOI (Digital object identifier)**.

Editorial Board

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия и биотехнология
Том 10 N 4 (35) 2020

12+

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
Volume 10 N 4 2020

Редактор О.А. Терновская
Перевод на английский язык: Thomas A. Beavitt, Christopher JP Scott, Michael Beavitt,
М.В. Стрелецкая, А.Р. Бойко, Н.Г. Попова, Е.А. Привалова
Компьютерный набор и верстка А.В. Куртовой
Ответственный за выпуск Ю.Н. Пожидаев

Дата выхода в свет 31.12.2020. Формат 60 x 90 / 8.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 25,5.
Тираж 500 экз. Зак. 220. Поз. плана 5н.

Отпечатано в типографии издательства
ФГБОУ ВО «Иркутский национальный
исследовательский технический университет»
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83

Издание распространяется бесплатно
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83

Адрес типографии:
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 81/12А