

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

12+

Том 11 N 4

2021



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ

**Прикладная химия
и биотехнология**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия
и биотехнология

Том 11 N 4 2021



ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского
технического университета



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия и биотехнология
Том 11 N 4 2021

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 Коре), (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)

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

© ФГБОУ ВО «ИРНИТУ», 2021

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
IZVESTIYA VUZOV.
Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya
Volume 11 N 4 2021
EDITORIAL BOARD

Editor in Chief :

Sergei N. Evstaf'ev

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)

Vera A. Chkhenskeli

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

© of FGBOU VO "INRTU", 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

- Базарова Ж. Г., Логвинова А. В., Базаров Б. Г. Особенности взаимодействия в тройных молибдатных системах с висмутом $M_2MoO_4-Bi_2(MoO_4)_3-Zr(MoO_4)_2$ в субсолидусной области.... 508
- Баданов С. В., Урумов А. В., Баяндин В. В., Шаглаева Н. С. Реакционная способность 2,3-дихлорпропена в реакциях радикальной сополимеризации..... 517

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

- Тхин Д. Б., Тхань В. К., Тхинь Б. Б. Химический состав и антимикробная активность эфирных масел *Atotum muricarpum* Elmer из Северного Вьетнама..... 523
- Голубева Ю. А., Смирнова К. С., Ключова Л. С., Поткин В. И., Лидер Е. В. Синтез и кристаллическая структура цитотоксического комплекса меди(II) с 1,10-фенантролин-5,6-дионом и производным изотиазола..... 531
- Столбиков А. С., Салаяев Р. К., Рекославская Н. И. Разработка и испытание методик определения наличия в пробах воды ДНК вирусов папилломы человека 6-го и 16-го типов..... 540
- Амброс Е. В., Чертенкова Е. И., Толузакова С. Ю., Трофимова Е. Г., Новикова Т. И. Влияние антиоксидантов и регуляторов роста на органогенез побегов в культуре апикальных меристем *Fragaria × ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier..... 549
- Гордеева Ю. Л., Ульянов Б. А., Гордеева Е. Л. Оценка технологических показателей стационарного состояния технологического процесса синтеза с нелинейной кинетикой роста микроорганизмов..... 561
- Уколова И. В., Кондратов И. Г., Кондакова М. А., Любушкина И. В., Грабельных О. И., Боровский Г. Б. Митохондриальный комплекс этиолированных побегов гороха..... 570
- Чхенкели В. А. Влияние препарата Траметин, получаемого на основе грибов-ксилотрофов из рода *Trametes*, на биосинтез интерферонов и его профилактическую активность против респираторных заболеваний телят..... 581
- Еремеева Н. Б., Макарова Н. В. Изучение антиоксидантных свойств лекарственных растений и их влияние на микробную порчу полуфабрикатов мяса, птицы и рыбы..... 590
- Некрасова Ю. О., Мезенова О. Я., Мерзель И.-Т. Обоснование использования биопотенциала гидролизатов коллагенсодержащего рыбного сырья в протеиновом спортивном питании..... 603
- Кобелев А. В., Клементьев С. В., Сироткин А. С. Процессы агглютинации культур активного ила под действием внеклеточных лектинов..... 617
- Нечипоренко А. П., Везо О. С., Нечипоренко У. Ю., Плотникова Л. В., Ситникова В. Е., Украинцева П. И., Плотников П. П. Оптические свойства медов: методы ИК-Фурье спектроскопии и рефрактометрии..... 627
- Матвеев Ю. И., Аверьянова Е. В. Роль цистеина в формировании доменных структур папаина и легумина гороха, принимающих участие в ограниченном протеолизе..... 642
- Салищева О. В., Просеков А. Ю., Молдагулова Н. Е., Пугачев В. М. Синтез, антимикробная и антифунгицидная активность комплексов платины (II) и палладия (II)..... 651

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

- Паламарчук М. С., Шлык Д. Х., Братская С. Ю. Влияние механохимической активации на растворение трилоном Б модельных отложений продуктов коррозии, образованных на ионообменных смолах..... 663
- Жолнеркевич В. И., Грушова Е. И. Использование метода ИК-спектроскопии при анализе эффективности селективной очистки масляных экстрактов..... 673

CONTENTS

CHEMICAL SCIENCES

- Bazarova J. G., Logvinova A. V., Bazarov B. G.** Interactions in ternary bismuth-containing molybdate systems $M_2MoO_4-Bi_2(MoO_4)_3-Zr(MoO_4)_2$ in the subsolidus region..... 508
- Badanov S. V., Urumov A. V., Bayandin V. V., Shaglaeva N. S.** Reactivity of 2,3-Dichloropropene in free-radical copolymerization reactions..... 517

PHYSICAL-CHEMICAL BIOLOGY

- Thin D. B., Thanh V. Q., Thinh B. B.** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils extracted from *Amomum muricarpum* Elmer from North Vietnam..... 523
- Golubeva Yu. A., Smirnova K. S., Klyushova L. S., Potkin V. I., Lider E. V.** Synthesis and crystal structure of cytotoxic copper(II) complex with 1,10-phenanthroline-5,6-dione and isothiazole derivative..... 531
- Stolbikov A. S., Salyaev R. K., Rekoslavskaya N. I.** Development and testing of procedures for detecting HPV 6 and HPV 16 DNA in water samples..... 540
- Ambros E. V., Chertenkova E. I., Toluzakova S. Y., Trofimova E. G., Novikova T. I.** Effect of antioxidants and growth regulators on shoot organogenesis in the apical meristem culture of *Fragaria × ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier..... 549
- Gordeeva Y. L., Ul'yanov B. A., Gordeeva E. L.** Estimation of parameters characterizing a steady-state synthesis process with nonlinear microorganism growth kinetics..... 561
- Ukolova I. V., Kondratov I. G., Kondakova M. A., Lyubushkina I. V., Grabelnykh O. I., Borovskii G. B.** Mitochondrial complexome of etiolated pea shoots..... 570
- Chkhenkeli V. A.** Veterinary drug Trametin obtained on the basis of *Trametes pubescens* xylotroph fungi: its effect on the biosynthesis of interferons and its prophylactic activity against calf respiratory diseases..... 581
- Eremeeva N. B., Makarova N. V.** Antioxidant properties of medicinal plants and their effect on microbial spoilage of semi-finished meat, poultry and fish..... 590
- Nekrasova Yu. O., Mezenova O. Ya., Moersel J.-Th.** Biopotential of collagen-containing hydrolysates obtained from fish raw materials for protein sports nutrition..... 603
- Kobelev A. V., Klement'ev S. V., Sirotkin A. S.** Agglutination processes of activated sludge cultures induced by extracellular lectins..... 617
- Nechiporenko A. P., Vezo O. S., Nichiporenko U. Yu., Plotnikova L. V., Ukraintseva P. A., Ukraintseva P. I., Plotnikov P. P.** Optical properties of honey: FTIR spectroscopy and refractometry..... 627
- Matveev Yu. I., Averyanova E. V.** The role of cysteine in the formation of domain structures of papain and legumin in peas, involved in limited proteolysis..... 642
- Salishcheva O. V., Prosekov A. Yu., Moldagulova N. E., Pugachev V. M.** Platinum (II) and palladium (II) complexes: synthesis, antimicrobial and antifungal activity..... 651

CHEMICAL TECHNOLOGY

- Palamarchuk M. S., Shlyk D. Kh., Bratskaya S. Yu.** Influence of mechanochemical activation on dissolving model corrosion films formed on ion-exchange resins using Trilon B..... 663
- Zholnerkevich V. I., Grushova E. I.** IR spectroscopy for analysing solvent extraction efficiency of oil extracts..... 673

Научная статья

УДК 546.776; 548.736.4

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-508-516>



Особенности взаимодействия в тройных молибдатных системах с висмутом $M_2MoO_4-Bi_2(MoO_4)_3-Zr(MoO_4)_2$ в субсолидусной области

Жибзема Гармаевна Базарова*, Александра Владимировна Логвинова***, Баир Гармаевич Базаров***

*Байкальский институт природопользования СО РАН, г. Улан-Удэ, Российская Федерация

**Бурятский государственный университет им. Д. Банзарова, г. Улан-Удэ, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Базарова Жибзема Гармаевна, jbaz@binm.ru

Аннотация. Одной из фундаментальных проблем материаловедения является установление взаимосвязи между химическим составом, структурой и свойствами материала. Решение этой задачи возможно путем изучения многокомпонентных систем и направленным синтезом перспективных соединений. К числу материалов, представляющих практический интерес, относятся активные диэлектрики на основе сложноокисных соединений, в частности – молибдатов. Среди сложных молибдатов и вольфраматов наибольший интерес вызывают тройные молибдаты каркасного строения структурных типов – насикон, перовскит, лангбейнит и другие, поскольку благодаря своим широким возможностям варьирования элементного и количественного составов они являются удобными модельными объектами для структурно-химического дизайна, установления генетических взаимосвязей «состав – структура – свойства». Висмутсодержащие сложные молибдатные системы могут обеспечить образование фаз с сегнето-пьезоэлектрическими, ионными и другими свойствами. В работе впервые исследована тройная солевая система $Rb_2MoO_4-Bi_2(MoO_4)_3-Zr(MoO_4)_2$ методом пересекающихся разрезов в субсолидусной области (450–650 °C). Определены квазибинарные разрезы и проведена триангуляция. В системе образуются тройные молибдаты $Rb_5BiZr(MoO_4)_6$ и $Rb_2BiZr_2(MoO_4)_{6,5}$. Соединения получены керамической технологией и изоструктурны ранее полученным нами молибдатам РЗЭ состава $M_5LnZr(MoO_4)_6$, содержат трехвалентный висмут вместо редкоземельных элементов. Структура $Rb_5BiZr(MoO_4)_6$ уточнена методом Ритвельда с помощью пакета программ TOPAS 4.2. Тройной молибдат кристаллизуется в тригональной сингонии с пространственной группой $R\bar{3}c$ с параметрами элементарных ячеек $a=10,7756(2)$, $c=39,0464(7)$ Å. Исследования термических свойств тройных молибдатов $M_5BiZr(MoO_4)_6$ показали, что они претерпевают фазовый переход первого рода в области температур 450–600 °C. Проанализированы ИК- и КР-спектры $M_5BiZr(MoO_4)_6$ и подтверждено, что тройные молибдаты кристаллизуются в пространственной группе $R\bar{3}c$. Проведена сравнительная характеристика фазовых диаграмм $M_2MoO_4-Bi_2(MoO_4)_3-Zr(MoO_4)_2$ и установлено, что фазовые равновесия этих систем зависят от природы молибдатов одновалентных элементов.

Ключевые слова: квазибинарные разрезы, концентрационные треугольники, фазообразование, триангуляция, колебательная спектроскопия

Благодарности. Авторы выражают благодарность Е.В. Ковтунец, сотруднику лаборатории оксидных систем Байкальского института природопользования СО РАН за уточнение структуры $Rb_5BiZr(MoO_4)_6$ методом Ритвельда.

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Байкальского института природопользования СО РАН № 0273-2021-0008.

Для цитирования: Базарова Ж. Г., Логвинова А. В., Базаров Б. Г. Особенности взаимодействия в тройных молибдатных системах с висмутом $M_2MoO_4-Bi_2(MoO_4)_3-Zr(MoO_4)_2$ в субсолидусной области // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 508-516. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-508-516>.

Interactions in ternary bismuth-containing molybdate systems $M_2MoO_4-Bi_2(MoO_4)_3-Zr(MoO_4)_2$ in the subsolidus region

Jibzema G. Bazarova*, Alexandra V. Logvinova***,
Bair G. Bazarov***

*Baikal Institute of Nature Management SB RAS, Ulan-Ude, Russian Federation

**Buryat State University named after D. Banzarov, Ulan-Ude, Russian Federation

Corresponding author: Jibzema G. Bazarova, jbaz@binm.ru

Abstract. A fundamental problem in materials science consists in establishing a relationship between the chemical composition, structure, and properties of materials. This issue can be solved through the study of multicomponent systems and the directed synthesis of promising compounds. Of practical interest here are active dielectrics that are based on complex oxide compounds, specifically molybdates. Among complex molybdates and tungstates, ternary caged molybdates of the following structural types are of greatest importance: nasicon, perovskite, langbeinite, etc. Due to their widely varying elemental and quantitative compositions, such molybdates are convenient models for structural and chemical design, as well as the establishment of “composition–structure–properties” genetic relationships. Bismuth-containing complex molybdate systems exhibit the formation of phases having ferro-piezoelectric, ionic, and other properties. In this work, the $Rb_2MoO_4-Bi_2(MoO_4)_3-Zr(MoO_4)_2$ ternary salt system was studied for the first time using the method of intersecting sections in the subsolidus region (450–650 °C). To this end, quasibinary sections were identified; triangulation was performed. Ternary molybdates $Rb_5BiZr(MoO_4)_6$ and $Rb_2BiZr_2(MoO_4)_{6.5}$ were formed in the system using a ceramic technology. These compounds are isostructural to the previously obtained REE molybdates ($M_5LnZr(MoO_4)_6$) but contain trivalent bismuth instead of rare earth elements. The structure of $Rb_5BiZr(MoO_4)_6$ was adjusted via the Rietveld refinement technique using the TOPAS 4.2 software package. The ternary molybdate crystallizes in a trigonal system, with the following unit cell parameters of the $R\bar{3}c$ space group: $a = 10.7756(2)$ and $c = 39.0464(7)$ Å. According to the studies of thermal properties exhibited by $M_5BiZr(MoO_4)_6$, these ternary molybdates undergo the first-order phase transition in the temperature range of 450–600 °C. The IR and Raman spectra of $M_5BiZr(MoO_4)_6$ reveal the crystallization of ternary molybdates in the $R\bar{3}c$ space group. The conducted comparative characterization of $M_2MoO_4-Bi_2(MoO_4)_3-Zr(MoO_4)_2$ phase diagrams suggests that the phase equilibria of these systems depend on the nature of molybdates of monovalent elements.

Keywords: quasibinary sections, concentration triangles, phase formation, triangulation, vibrational spectroscopy

Acknowledgment. The authors are grateful to E.V. Kovtunets structure for the refining of $Rb_5BiZr(MoO_4)_6$ structure by the Rietveld method.

Funding. The work was supported by the State assignment for the Baikal Institute of Nature Management SB RAS (project no. 0273-2021-0008).

For citation: Bazarova J. G., Logvinova A. V., Bazarov B. G. Interactions in ternary bismuth-containing molybdate systems $M_2MoO_4-Bi_2(MoO_4)_3-Zr(MoO_4)_2$ in the subsolidus region. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):508-516. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-508-516>.

ВВЕДЕНИЕ

Успешное развитие современного материалоуправления во многом обеспечивается за счет получения функциональных материалов, значительная часть которых относится к сложным оксидам. Задача создания новых функциональных материалов, отвечающих разнообразным и жестким требованиям их эксплуатации, может быть решена путем комплексного физико-химического изучения конкретных систем и эффективного поиска взаимосвязи строения соединений с их свойствами. К числу материалов,

представляющих практический интерес на современном этапе развития науки и техники, относятся активные диэлектрики на основе сложнокислотных соединений, в частности – молибдатов. К настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал по фазовым равновесиям молибдатных систем. Соединения, образующиеся в них, имеют свойства сегнетоэлектриков, сегнетоэластиков [1–3], твердых электролитов [4–7], люминофоров [8–13], лазерные и другие [14, 15]. Изучение фазообразования в молибдатных системах и установление

взаимосвязи между составом, строением и свойствами выявленных соединений позволяют получать новые функциональные материалы, что и является актуальной задачей материаловедения. Ранее были исследованы системы $M_2MoO_4 - R_2(MoO_4)_3 - Zr(MoO_4)_2$ ($M = K, Rb, Tl, Cs$; $R = La-Lu, Al, Fe, Cr, Y$) в субсолидусной области. В системах образуются тройные молибдаты составов (молярное соотношение исходных компонентов): 5:1:2, 1:1:1, 2:1:4 [16]. Благодаря наличию у Bi^{3+} неподеленной пары электронов и высокой поляризуемости соединения, образующиеся в системах с участием $Bi_2(MoO_4)_3$, представляют особый интерес и имеют большие возможности для структурно-химического дизайна. Система $Rb_2MoO_4 - Bi_2(MoO_4)_3 - Zr(MoO_4)_2$ не исследована.

Цель настоящей работы – исследование системы $Rb_2MoO_4 - Bi_2(MoO_4)_3 - Zr(MoO_4)_2$ и обобщение фазообразования в тройных солевых системах, содержащих висмут: $M_2MoO_4 - Bi_2(MoO_4)_3 - Zr(MoO_4)_2$ ($M = K, Rb, Cs, Tl$).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Поликристаллические образцы тройных молибдатов получены методом твердофазного синтеза. В качестве исходных реагентов использованы промышленные реактивы Rb_2MoO_4 , $Bi(NO_3)_3$, MoO_3 и $ZrO(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$ марки ч.д.а. Молибдат трехвалентного висмута $Bi_2(MoO_4)_3$ получен отжигом исходных компонентов при температурах 450–800 °С с продолжительностью 100 ч и промежуточной гомогенизацией. Синтез $Zr(MoO_4)_2$ проводили ступенчатым отжигом стехиометрической смеси азотнокислого цирконила и триоксида молибдена в интервале температур 450–750 °С в течение 80–100 ч. Новые тройные молибдаты получали при отжиге стехиометрических количеств реакционных смесей Rb_2MoO_4 ,

$Bi_2(MoO_4)_3$ и $Zr(MoO_4)_2$ в интервале температур 300–650 °С при ступенчатом повышении температуры с шагом 50 °С, времени 100 ч и гомогенизацией перед каждым изменением режима термической обработки. Прокаливание образцов проводили на воздухе в муфельной печи.

Достижение равновесия в системах контролировали рентгенографически на дифрактометре фирмы «Bruker» с использованием $CuK\alpha$ -излучения. Спектры КР зарегистрированы на КР-Фурье спектрометре RFS 100/S (Bruker, Германия): возбуждение Nd:YAG-лазером (длительность импульса – 650 мкс, длина волны – 1064 нм). ИК-спектры сняты на спектрометре Tenser 27 фирмы Bruker (Германия). Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) проведена на термоанализаторе STA 449 F1 Jupiter® (Netzsch, Германия) со скоростью подъема температуры 10 К/мин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Система $Rb_2MoO_4 - Bi_2(MoO_4)_3 - Zr(MoO_4)_2$ изучена методом пересекающихся разрезов в субсолидусной области, определены квазибинарные разрезы в системе $Rb_2MoO_4 - Bi_2(MoO_4)_3 - Zr(MoO_4)_2$ и проведена их триангуляция (рис. 1). Здесь же приведены результаты исследования систем $M_2MoO_4 - Bi_2(MoO_4)_3 - Zr(MoO_4)_2$ ($M = K, Cs$).

Триангуляция проводилась с использованием литературных данных по ограничивающим двойным системам. В системах $M_2MoO_4 - Zr(MoO_4)_2$ ($M = K, Rb, Cs$) образуются двойные молибдаты составов $M_8Zr(MoO_4)_6$ (4:1), $M_2Zr(MoO_4)_3$ (1:1) [17, 18], в $M_2MoO_4 - Bi_2(MoO_4)_3$ образуются двойные молибдаты $M_5Bi(MoO_4)_4$ (5:1 и 1:1) [19, 20]. В системе $Bi_2(MoO_4)_3 - Zr(MoO_4)_2$ образование новых фаз не выявлено.

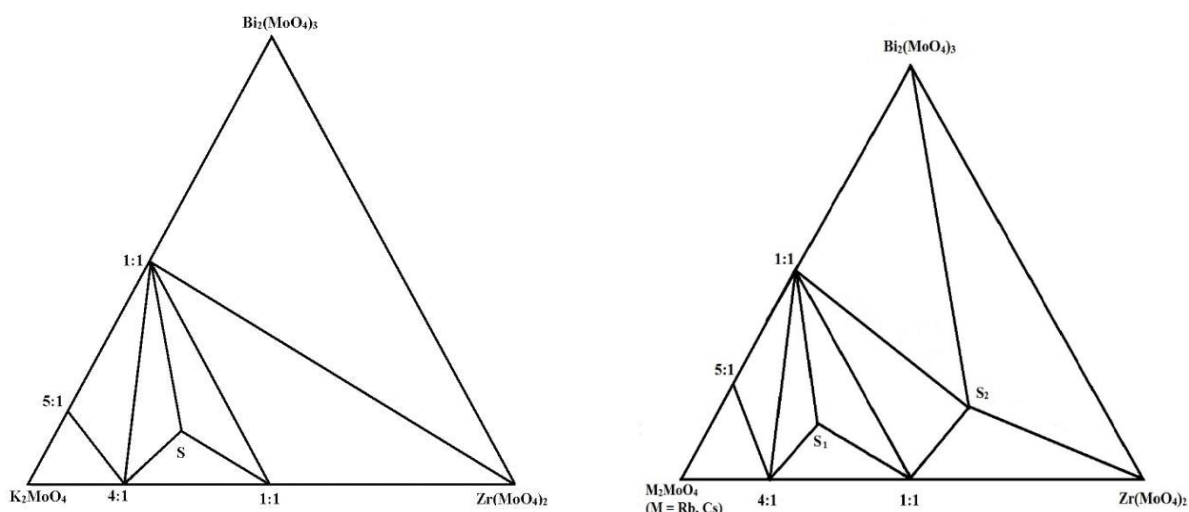


Рис. 1. Фазовые соотношения в системах $M_2MoO_4 - Bi_2(MoO_4)_3 - Zr(MoO_4)_2$; S_1 (5:1:2) – $M_5BiZr(MoO_4)_6$, S_2 (2:1:4) – $Rb_2BiZr_2(MoO_4)_{6,5}$

Fig. 1. Phase relations in the systems $M_2MoO_4 - Bi_2(MoO_4)_3 - Zr(MoO_4)_2$; S_1 (5:1:2) – $M_5BiZr(MoO_4)_6$; S_2 (2:1:4) – $Rb_2BiZr_2(MoO_4)_{6,5}$

В ходе исследования тройной солевой системы $\text{Rb}_2\text{MoO}_4\text{--Bi}_2(\text{MoO}_4)_3\text{--Zr}(\text{MoO}_4)_2$ установлено образование двух новых соединений – S_1 и S_2 , кристаллизующихся в двух различных структурах (рис. 2, 3).

Данные порошковой дифракции $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$ для анализа по Ритвельду получали при комнатной температуре с помощью порошкового дифрактометра D8 ADVANCE (Bruker, Германия) (Cu-K α -излучение) и линейного детектора VANTEC. Размер шага 2θ составлял $0,016^\circ$, время счета – 1 с на шаг. По данным РФА, новый тройной молибдат $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$ (S_1) изоструктурен $\text{Rb}_5\text{CeZr}(\text{MoO}_4)_6$ (пр.гр. R $\bar{3}c$, Z=6) [21]. Все рефлексы на рентгенограмме молибдата $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$ индицируются в предположении изоструктурности $\text{Rb}_5\text{CeZr}(\text{MoO}_4)_6$. На рис. 2 представлены экспериментальная, вычисленная и разностная рентгенограммы $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$.

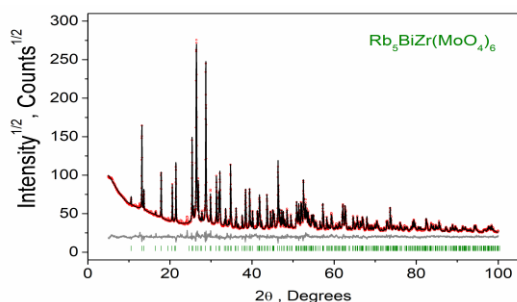


Рис. 2. Результаты обработки рентгенограммы $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$ с помощью пакета программ TOPAS 4.2: черная линия – экспериментальные данные; красная линия – рассчитанный профиль; кривая внизу – разница между экспериментальными и рассчитанными значениями; штрихи соответствуют межплоскостным расстояниям

Fig. 2. Results of $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$ X-ray diffraction pattern processing using the TOPAS 4.2 software package: black line – experimental data; red line – calculated profile; the curve below is the difference between experimental and calculated values; dashes correspond to interplanar distances

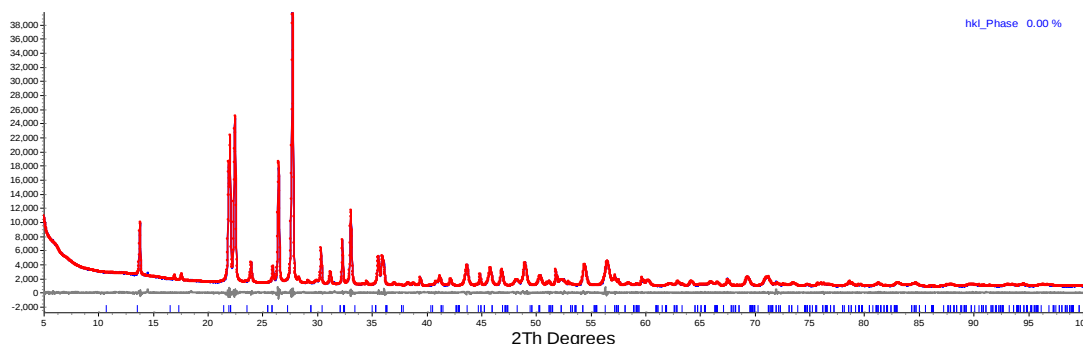


Рис. 3. Рентгенограмма соединения $\text{Rb}_2\text{RZR}_2(\text{MoO}_4)_{6,5}$

Fig. 3. X-ray diffraction pattern of the compound $\text{Rb}_2\text{RZR}_2(\text{MoO}_4)_{6,5}$

Структурный аналог фазы $\text{Rb}_2\text{BiZr}_2(\text{MoO}_4)_{6,5} - S_2$ не найден, его рентгенограмма приведена на рис. 3.

Структура $\text{Rb}_5\text{CeZr}(\text{MoO}_4)_6$ [21] взята в качестве модели для уточнения $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$ методом Ритвельда с использованием программного комплекса TOPAS 4.2¹.

Две позиции Ce/Zr были заняты ионами Bi/Zr и их заселенность уточнялась с учетом того, что сумма заселенностей в каждой позиции равна 1. Уточнение было стабильным и дало удовлетворительные R-факторы (табл. 1, см. рис. 2).

Таблица 1. Кристаллографические характеристики тройного молибдата $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$

Table 1. Crystallographic characteristics of ternary molybdate $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$

Параметры элементарной ячейки	Значение
a, Å	10,7756 (2)
c, Å	39,0464 (7)
V, Å ³	3926,4 (2)
2θ-interval, °	8–100
R _{wp} , %	5,47
R _p , %	4,01
R _{exp} , %	2,18
χ ²	2,51
R _B , %	2,77

Координаты атомов и длины основных связей приведены в табл. 2 и 3 соответственно.

Кристаллическая структура молибдата $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$ представляет собой трехмерный смешанный каркас, состоящий из последовательно чередующихся Мо-тетраэдров и двух видов октаэдров – M1 и M2, с разными коэффициентами заселенности Bi и Zr в октаэдрах (Bi,Zr)O₆, соединенных друг с другом через общие кислородные вершины (рис. 4). Это является характерной особенностью данной группы молибдатов.

¹Bruker AXS TOPAS V4: General profile and structure analysis software for powder diffraction data. User Manual. Bruker AXS, Karlsruhe, Germany. 2008. Available from: <http://algol.fis.uc.pt/jap/TOPAS%204-2%20Users%20Manual.pdf> [Accessed 15th September 2021].

Таблица 2. Дробные координаты атомов и параметры изотропного смещения (Å) $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$

Table 2. Fractional atomic coordinates and isotropic displacement parameters (Å) $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$

Атом	x	y	z	B_{iso}
Bi	0	0	0	2,24 (9)
Zr	0	0	1/4	0,5 (1)
Rb1	0	0	0,35412 (8)	3,8 (1)
Rb2	0,3885 (3)	0	1/4	2,7 (1)
Mo	0,3529 (2)	0,0614 (1)	0,03398 (3)	1,77 (8)
O1	0,186 (1)	0,042 (1)	0,0402 (3)	1,0 (3)
O2	0,4849 (6)	0,2265 (3)	0,0516 (1)	1,5 (4)
O3	0,364 (2)	-0,082 (1)	0,0518 (3)	5,0 (5)
O4	0,3992 (3)	0,0474 (4)	-0,00987 (8)	2,8 (4)

Таблица 3. Длины основных связей (Å) $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$

Table 3. Main bond lengths (Å) $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$

Мо-тетраэдр		Zr- и Bi-октаэдр	
Mo1—O1	1,721 (6)	Zr—O2 ^{II}	2,107 (4) x 6
Mo1—O2	1,770 (4)	Bi—O1 ^I	2,40 (1) x 6
Mo1—O3	1,75 (1)	—	—
Mo1—O4	1,811 (3)	—	—
<Mo1—O>	1,76	—	—
Rb(1)-полиэдр			
Rb1—O2 ^{II}	3,302 (5) x 3	Rb1—O3 ^{IV}	2,83 (1) x 3
Rb1—O4 ^{II}	3,017 (3) x 3	—	—
Rb(2)-кубооктаэдр			
Rb2—O2 ^{II}	3,222 (5) x 2	Rb2—O1 ^{II}	3,247 (12) x 2
Rb2—O3 ^{VI}	3,36 (1) x 2	Rb2—O3 ^V	3,17 (1) x 2
Rb2—O4 ^{IV}	2,966 (3) x 2	Rb2—O1 ^V	3,446 (12) x 2

Коды симметрии: I – $-x, -y, -z$; II – $-x+2/3, -y+1/3, -z+1/3$; IV – $-x+y+2/3, -x+1/3, z+1/3$; V – $y+2/3, -x+y+1/3, -z+1/3$; VI – $-y+1/3, -x+2/3, z+1/6$.

Ранее нами был синтезирован таллиевый аналог висмутсодержащих молибдатов [16]. Сравнение фазовых диаграмм систем $\text{M}_2\text{MoO}_4 - \text{R}_2(\text{MoO}_4)_3 - \text{Zr}(\text{MoO}_4)_2$ показывает, что фазообразование в них зависит от структуры молибдатов одновалентных элементов. Висмутсодержащие молибдаты – $\text{M}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$ ($R = \text{Cs}, Z=6$), входят в обширную группу изоструктурных тройных молибдатов структурного типа $\text{K}_5\text{InHf}(\text{MoO}_4)_6$ [22]. В табл. 4 приведены кристаллографические характеристики тройных молибдатов $\text{M}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$ ($M = \text{K}, \text{Rb}, \text{Cs}, \text{Tl}$). С увеличением ионного радиуса M^+ параметры и объемы элементарной ячейки увеличиваются.

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) изучены термические свойства синтезированных молибдатов $\text{M}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$. Как пример на рис. 5 приведена кривая ДСК $\text{K}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$, на которой зафиксировано два эндотермических эффекта: первый – при температуре 508 °С, второй – при 626 °С, соответствует температуре плавления.

Таблица 4. Параметры элементарной ячейки тройных молибдатов состава $\text{M}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$

Table 4. Unit cell parameters of ternary molybdates $\text{M}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$

Соединение $R = \text{Cs}, Z=6$	Параметры элементарной ячейки			Источник
	a, Å	c, Å	V, Å ³	
$\text{K}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$	10,6180 (0)	37,6026(2)	3641,4(2)	[23]
$\text{Tl}_5\text{BiHf}(\text{MoO}_4)_6$	10,6801 (4)	38,5518(14)	38,083(2)	[16]
$\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$	10,7756 (2)	38,0464	3926,4 (2)	Данная работа
$\text{Cs}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$	10,9569 (2)	39,804(4)	41,384(4)	[16]

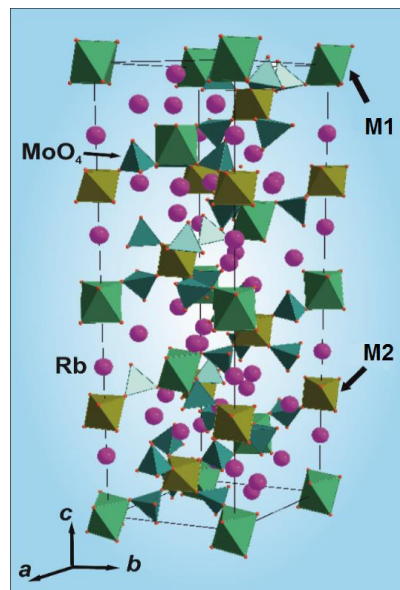


Рис. 4. Кристаллическая структура $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$

Fig. 4. Crystal structure of $\text{Rb}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$

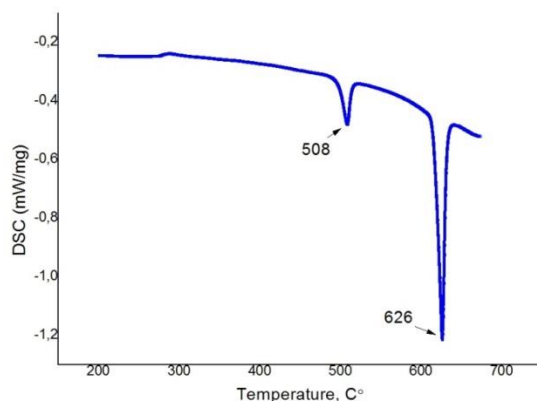


Рис. 5. Кривая ДСК $\text{K}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$

Fig. 5. DSC curve $\text{K}_5\text{BiZr}(\text{MoO}_4)_6$

Природа первого эндоэффекта была определена как фазовый переход. Температурные измерения включали 2 цикла нагревания и 2 цикла охлаждения образца (рис. 6). Смещение температур эндоэффекта при охлаждении и нагревании образца позволяет зафиксировать температурный гистерезис при 40 °С. Этот факт свидетельствует о том, что обнаруженный фазовый переход в $K_5BiZr(MoO_4)_6$ является переходом первого рода.

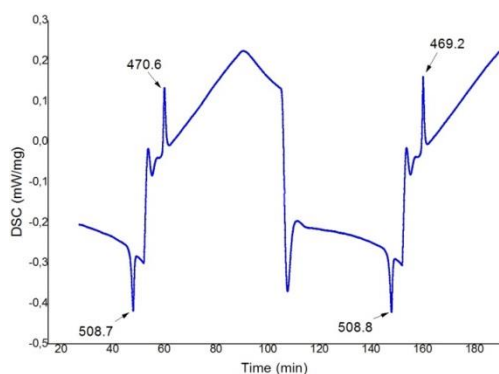


Рис. 6. Температурный цикл измерений $K_5BiZr(MoO_4)_6$

Fig. 6. Temperature measurement cycle $K_5BiZr(MoO_4)_6$

Получены и проанализированы колебательные спектры тройных молибдатов $M_5BiZr(MoO_4)_6$. Как пример в табл. 5 приведены частоты колебаний ИК- и КР-спектров $Cs_5BiZr(MoO_4)_6$ ($R \bar{3}c$, $Z=6$) – представителя изоструктурных висмутовых соединений структурного типа $K_5InHf(MoO_4)_6$ [22]. Анализ колебательных спектров $Cs_5BiZr(MoO_4)_6$ показал, что колебания, активные в ИК-спектре, не активны в комбинационном рассеянии и что они не совпадают. Это подчеркивает, что тройной молибдат $Cs_5BiZr(MoO_4)_6$ кристаллизуется в центросимметричной пр.гр. $R \bar{3}c$ [24].

Таблица 5. Частоты колебаний в ИК- и КР-спектрах тройного молибдата $Cs_5BiZr(MoO_4)_6$

Table 5. Vibration frequencies in the IR and Raman spectra of ternary molybdate $Cs_5BiZr(MoO_4)_6$

Частота колебаний, cm^{-1}		Отнесение [24]	
ИК	КР	ИК	КР
931	928	ν_1	ν_1
889			
781	741		
729	735	ν_3	ν_3
707	671		
401	576	ν_4	ν_4
—	295		
—	261		
—	254		
—	226		
—	208		
—	197		
—	166		
—	113		
—	80		
—	35		
			ν_2
			либрация MoO_4
			трансляция MoO_4

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые исследованы тройные солевые системы $Rb_2MoO_4-Bi_2(MoO_4)_3-Zr(MoO_4)_2$ и построены субсолидусные фазовые диаграммы.

Установлено образование в системе двух новых соединений составов $Rb_5BiZr(MoO_4)_6$ и $Rb_2BiZr_2(MoO_4)_{6.5}$.

Методом Ритвельда уточнена структура $Rb_5BiZr(MoO_4)_6$.

Проведен сравнительный анализ фазовых диаграмм $M_2MoO_4-Bi_2(MoO_4)_3-Zr(MoO_4)_2$ и установлена трансформация фазовых диаграмм в зависимости от природы молибдатов одновалентных элементов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Isupov V. A. Binary molybdates and tungstates of mono and trivalent elements as possible ferroelastics and ferroelectrics // *Ferroelectrics*. 2005. Vol. 320, no. 1. P. 63–90. <https://doi.org/10.1080/00150190500259699>.
2. Isupov V. A. Ferroelectric and ferroelastic phase transitions in molybdates and tungstates of monovalent and bivalent elements // *Ferroelectrics*. 2005. Vol. 322, no. 1. P. 83–114. <https://doi.org/10.1080/00150190500315574>.
3. Tsyrenova G. D., Pavlova E. T., Solodovnikov S. F., Popova N. N., Kardash T. Yu., Stefanovich S. Yu., et al. New ferroelastic $K_2Sr(MoO_4)_2$: synthesis, phase transitions, crystal and domain structures, ionic conductivity // *Journal of Solid State Chemistry*. 2016. Vol. 237. P. 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2016.01.011>.
4. Savina A. A., Solodovnikov S. F., Basovich O. M., Solodovnikova Z. A., Belov D. A., Pokholok K. V., et al. New double molybdate $Na_9Fe(MoO_4)_6$: synthesis, structure, properties // *Journal of Solid State Chemistry*. 2013. Vol. 205. P. 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2013.07.007>.
5. Savina A. A., Morozov V. A., Buzlukov A. L., Arapova I. Yu., Stefanovich S. Yu., Baklanova Ya. V., et al. New solid electrolyte $Na_9Al(MoO_4)_6$: structure and Na^+ ion conductivity // *Chemistry of Materials*. 2017. Vol. 29, no. 20. P. 8901–8913. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b03989>.
6. Solodovnikov S. F., Solodovnikova Z. A., Zolotova E. S., Yudin V. N., Gulyaeva O. A., Tushinova Y. L., et al. Nonstoichiometry in the systems $Na_2MoO_4-MMoO_4$ ($M = Co, Cd$), crystal structures of $Na_{3.36}Co_{1.32}(MoO_4)_3$, $Na_{3.13}Mn_{1.43}(MoO_4)_3$ and $Na_{3.72}Cd_{1.14}(MoO_4)_3$, crystal chemistry, compositions and ionic conductivity of alluaudite-type double molybdates and tungstates // *Journal of Solid State Chemistry*. 2017. Vol. 253. P. 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2017.05.031>.
7. Medvedeva N. I., Buzlukov A. L., Skachkov A. V.,

Savina A. A., Morozov V. A., Baklanova Ya. V., et al. Mechanism of sodium-ion diffusion in alluaudite-type $\text{Na}_5\text{Sc}(\text{MoO}_4)_4$ from NMR experiment and ab initio calculations // *Journal of Physical Chemistry C*. 2019. Vol. 123, no. 8. P. 4729–4738. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b11654>.

8. Fan W., He Y., Long L., Gao Y., Liu F., Liu J. Multiplexed excitations $\text{KGd}_{1-x}\text{Eu}_x(\text{MoO}_4)_2$ red-emitting phosphors with highly Eu^{3+} doping for white LED application // *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 2021. Vol. 32, no. 5. P. 6239–6248. <https://doi.org/10.1007/s10854-021-05339-1>.

9. Wang Y., Song M., Xiao L., Li Q. Upconversion luminescence of Eu^{3+} and Sm^{3+} single-doped NaYF_4 and $\text{NaY}(\text{MoO}_4)_2$ // *Journal of Luminescence*. 2021. Vol. 238. 118203. <https://doi.org/10.1016/j.jlum.2021.118203>.

10. Morozov V. A., Lazoryak B. I., Shmurak S. Z., Kiselev A. P., Lebedev O. I., Gauquelin N., et al. Influence of the structure on the properties of $\text{Na}_x\text{Eu}_y(\text{MoO}_4)_z$ red phosphors // *Chemistry of Materials*. 2014. Vol. 26, no. 10. P. 3238–3248. <https://doi.org/10.1021/cm500966g>.

11. Guo C., Gao F., Xu Y., Liang L., Shi F. G., Yan B. Efficient red phosphors $\text{Na}_5\text{Ln}(\text{MoO}_4)_4$: Eu^{3+} ($\text{Ln} = \text{La}, \text{Gd}$ and Y) for white LEDs // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2009. Vol. 42, no. 9. 095407. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/42/9/095407>.

12. Zhao C., Yin X., Huang F., Hang Y. Synthesis and photoluminescence properties of the high-brightness Eu^{3+} -doped $\text{M}_2\text{Gd}_4(\text{MoO}_4)_7$ ($\text{M} = \text{Li}, \text{Na}$) red phosphors // *Journal of Solid State Chemistry*. 2011. Vol. 184, no. 12. P. 3190–3194. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2011.09.025>.

13. Pandey I. R., Karki S., Daniel D. J., Kim H. J., Kim Y. D., Lee M. H., et al. Crystal growth, optical, luminescence and scintillation characterization of $\text{Li}_2\text{Zn}_2(\text{MoO}_4)_3$ crystal // *Journal of Alloys and Compounds*. 2021. Vol. 860. 158510. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2020.158510>.

14. Voron'ko Yu. K., Zharikov E. V., Lis D. A., Popov A. V., Smirnov V. A., Subbotin K. A., et al. Growth and spectroscopic studies of $\text{NaLa}(\text{MoO}_4)_2:\text{Tm}^{3+}$ crystals: a new promising laser material // *Optics and Spectroscopy*. 2008. Vol. 105, no. 4. P. 538–546. <https://doi.org/10.1134/S0030400X08100081>.

15. Gao S., Zhu Z., Wang Y., You Z., Li J., Wang H., et al. Growth and spectroscopic investiga-

tions of a new laser crystal Yb^{3+} -doped $\text{Na}_2\text{Gd}_4(\text{MoO}_4)_7$ // *Optical Materials*. 2013. Vol. 36, no. 2. P. 505–508. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2013.10.018>.

16. Bazarova J. G., Logvinova A. V., Bazarov B. G. Phase relations in the $\text{Rb}_2\text{MoO}_4\text{--R}_2(\text{MoO}_4)_3\text{--Zr}(\text{MoO}_4)_2$ ($\text{R} = \text{Al}, \text{Fe}, \text{Cr}, \text{Y}$) systems // *Inorganic Materials*. 2020. Vol. 56, no. 12. P. 1278–1283. <https://doi.org/10.1134/S0020168520120043>.

17. Клевцова Р. Ф., Золотова Е. С., Глинская Л. А., Клевцов П. В. Синтез двойных молибдатов циркония и гафния с цезием и кристаллическая структура $\text{Cs}_8\text{Zr}(\text{MoO}_4)_6$ // *Кристаллография*. 1980. Т. 25, N 5. С. 972–978.

18. Золотова Е. С., Подберезская Е. В., Клевцов П. В. Двойные молибдаты цезия с цирконием и гафнием $\text{CsM}(\text{IV})(\text{MoO}_4)_3$ // *Известия Сибирского отделения АН СССР*. 1976. Вып. 7. С. 93–95.

19. Лазоряк Б. И., Ефремов В. А. О строении пальмиеритоподобных $\text{K}_5\text{Nd}(\text{MoO}_4)_4$, $\text{K}_5\text{Bi}(\text{MoO}_4)_4$, $\text{Rb}_5\text{Gd}(\text{MoO}_4)_4$ // *Кристаллография*. 1986. Т. 31. N 2. С. 237–243.

20. Рыбакова Т. П., Трунов В. К. О двойных молибдатах $\text{Rb}_5\text{R}(\text{MoO}_4)_4$ // *Журнал неорганической химии*. 1971. Т. 16. № 1. Р. 277–281.

21. Gongorova L. I., Bazarov B. G., Chimitova O. D., Anshits A. G., Vereschagina T. A., Klevtsova R. F., et al. Crystal structure of a new ternary molybdate $\text{Rb}_5\text{CeZr}(\text{MoO}_4)_6$ // *Journal of Structural Chemistry*. 2012. Vol. 53, no. 2. P. 329–333. <https://doi.org/10.1134/S0022476612020175>.

22. Базаров Б. Г., Клевцова Р. Ф., Базарова Ц. Т., Глинская Л. А., Фёдоров К. Н., Базарова Ж. Г. Синтез и кристаллическая структура тройного молибдата $\text{K}_5\text{InHf}(\text{MoO}_4)_6$ // *Журнал неорганической химии*. 2005. Т. 50, N 8. С. 1240–1243.

23. Базарова Ж. Г., Тушинова Ю. Л., Логвинова А. В., Базаров Б. Г., Доржиева С. Г., Базарова Ц. Т. Синтез, структура и свойства тройных молибдатов $\text{K}_5\text{RZr}(\text{MoO}_4)_6$ в системах $\text{K}_2\text{MoO}_4\text{--R}_2(\text{MoO}_4)_3\text{--Zr}(\text{MoO}_4)_2$ ($\text{R} =$ трехвалентные элементы) // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019. Т. 9, N 2. С. 202–211. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-202-211>.

24. Петров К. И., Полозникова М. Э., Шарипов Х. Т., Фомичев В. В. Колебательные спектры молибдатов и вольфраматов: монография. Ташкент: Фан, 1990. 136 с.

REFERENCES

1. Isupov V. A. Binary molybdates and tungstates of mono and trivalent elements as possible ferroelastics and ferroelectrics. *Ferroelectrics*. 2005; 320(1):63–90. <https://doi.org/10.1080/00150190500259699>.

2. Isupov V. A. Ferroelectric and ferroelastic phase transitions in molybdates and tungstates of monovalent and bivalent elements. *Ferroelectrics*. 2005; 322(1):83–114. <https://doi.org/10.1080/00150190500315574>.

3. Tsyrenova G. D., Pavlova E. T., Solodovnikov S. F., Popova N. N., Kardash T. Yu., Stefanovich S. Yu., et al. New ferroelastic $\text{K}_2\text{Sr}(\text{MoO}_4)_2$: synthesis, phase transitions, crystal and domain structures, ionic conductivity. *Journal of Solid State Chemistry*. 2016; 237:64–71. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2016.01.011>.

4. Savina A. A., Solodovnikov S. F., Basovich O. M., Solodovnikova Z. A., Belov D. A., Pokholok K. V., et al. New double molybdate $\text{Na}_9\text{Fe}(\text{MoO}_4)_6$: synthesis,

structure, properties. *Journal of Solid State Chemistry*. 2013;205:149–153. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2013.07.007>.

5. Savina A. A., Morozov V. A., Buzlukov A. L., Arapova I. Yu., Stefanovich S. Yu., Baklanova Ya. V., et al. New solid electrolyte $\text{Na}_9\text{Al}(\text{MoO}_4)_6$: structure and Na^+ ion conductivity. *Chemistry of Materials*. 2017;29(20):8901–8913. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b03989>.

6. Solodovnikov S. F., Solodovnikova Z. A., Zolotova E. S., Yudin V. N., Gulyaeva O. A., Tushinova Y. L., et al. Nonstoichiometry in the systems Na_2MoO_4 – MMoO_4 ($M = \text{Co}, \text{Cd}$), crystal structures of $\text{Na}_{3.36}\text{Co}_{1.32}(\text{MoO}_4)_3$, $\text{Na}_{3.13}\text{Mn}_{1.43}(\text{MoO}_4)_3$ and $\text{Na}_{3.72}\text{Cd}_{1.14}(\text{MoO}_4)_3$, crystal chemistry, compositions and ionic conductivity of alluaudite-type double molybdates and tungstates. *Journal of Solid State Chemistry*. 2017;253:121–128. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2017.05.031>.

7. Medvedeva N. I., Buzlukov A. L., Skachkov A. V., Savina A. A., Morozov V. A., Baklanova Ya. V., et al. Mechanism of sodium-ion diffusion in alluaudite-type $\text{Na}_5\text{Sc}(\text{MoO}_4)_4$ from NMR experiment and ab initio calculations. *Journal of Physical Chemistry C*. 2019;123(8):4729–4738. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b11654>.

8. Fan W., He Y., Long L., Gao Y., Liu F., Liu J. Multiplexed excitations $\text{KGd}_{1-x}\text{Eu}_x(\text{MoO}_4)_2$ red-emitting phosphors with highly Eu^{3+} doping for white LED application. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 2021;32(5):6239–6248. <https://doi.org/10.1007/s10854-021-05339-1>.

9. Wang Y., Song M., Xiao L., Li Q. Upconversion luminescence of Eu^{3+} and Sm^{3+} single-doped NaYF_4 and $\text{NaY}(\text{MoO}_4)_2$. *Journal of Luminescence*. 2021;238:118203. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2021.118203>.

10. Morozov V. A., Lazoryak B. I., Shmurak S. Z., Kiselev A. P., Lebedev O. I., Gauquelin N., et al. Influence of the structure on the properties of $\text{Na}_x\text{Eu}_y(\text{MoO}_4)_z$ red phosphors. *Chemistry of Materials*. 2014;26(10):3238–3248. <https://doi.org/10.1021/cm500966g>.

11. Guo C., Gao F., Xu Y., Liang L., Shi F. G., Yan B. Efficient red phosphors $\text{Na}_5\text{Ln}(\text{MoO}_4)_4$: Eu^{3+} ($\text{Ln} = \text{La}, \text{Gd}$ and Y) for white LEDs. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2009;42(9):095407. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/42/9/095407>.

12. Zhao C., Yin X., Huang F., Hang Y. Synthesis and photoluminescence properties of the high-brightness Eu^{3+} -doped $\text{M}_2\text{Gd}_4(\text{MoO}_4)_7$ ($M = \text{Li}, \text{Na}$) red phosphors. *Journal of Solid State Chemistry*. 2011;184(12):3190–3194. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2011.09.025>.

13. Pandey I. R., Karki S., Daniel D. J., Kim H. J., Kim Y. D., Lee M. H., et al. Crystal growth, optical, luminescence and scintillation characterization of $\text{Li}_2\text{Zn}_2(\text{MoO}_4)_3$ crystal. *Journal of Alloys and Compounds*. 2021;860:158510. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2020.158510>.

14. Voron'ko Yu. K., Zharikov E. V., Lis D. A., Popov A. V., Smirnov V. A., Subbotin K. A., et al. Growth and spectroscopic studies of $\text{NaLa}(\text{MoO}_4)_2:\text{Tm}^{3+}$ crystals: a new promising laser material. *Optics and Spectroscopy*. 2008;105(4):538–546. <https://doi.org/10.1134/S0030400X08100081>.

15. Gao S., Zhu Z., Wang Y., You Z., Li J., Wang H., et al. Growth and spectroscopic investigations of a new laser crystal Yb^{3+} -doped $\text{Na}_2\text{Gd}_4(\text{MoO}_4)_7$. *Optical Materials*. 2013;36(2):505–508. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2013.10.018>.

16. Bazarova J. G., Logvinova A. V., Bazarov B. G. Phase relations in the Rb_2MoO_4 – $\text{R}_2(\text{MoO}_4)_3$ – $\text{ZR}(\text{MoO}_4)_2$ ($R = \text{Al}, \text{Fe}, \text{Cr}, \text{Y}$) systems. *Inorganic Materials*. 2020;56(12):1278–1283. <https://doi.org/10.1134/S0020168520120043>.

17. Klevtsova R. F., Zolotova E. S., Glinskaya L. A., Klevtsov P. V. Synthesis of zirconium and hafnium double molybdates with cesium and the crystal structure of $\text{Cs}_8\text{Zr}(\text{MoO}_4)_6$. *Kristallografiya = Crystallography*. 1988;25(5):972–978. (In Russian).

18. Zolotova E. S., Podberezenskaya E. V., Klevtsov P. V. Double cobalt molybdates with zirconium and hafnium $\text{CsM}(\text{IV})(\text{MoO}_4)_3$. *Izvestiya Sibirskogo Otdeleniya AN SSSR = Proceedings of the USSR Academy of Science, Siberian Branch*. 1976;7:93–95. (In Russian).

19. Lazoryak B. I., Efremov V. A. On the structure of palmyrite-like $\text{K}_5\text{Nd}(\text{MoO}_4)_4$, $\text{K}_5\text{Bi}(\text{MoO}_4)_4$, $\text{Rb}_5\text{Gd}(\text{MoO}_4)_4$. *Kristallografiya = Crystallography*. 1986;31(2):237–243. (In Russian).

20. Rybakova T. P., Trunov V. K. On double molybdates $\text{Rb}_5\text{R}(\text{MoO}_4)_4$. *Journal of Inorganic Chemistry*. 1971;16(1):277–281. (In Russian).

21. Gongorova L. I., Bazarov B. G., Chimitova O. D., Anshits A. G., Vereschagina T. A., Klevtsova R. F., et al. Crystal structure of a new ternary molybdate $\text{Rb}_5\text{CeZr}(\text{MoO}_4)_6$. *Journal of Structural Chemistry*. 2012;53(2):329–333. <https://doi.org/10.1134/S0022476612020175>.

22. Bazarov B. G., Klevtsova R. F., Bazarova Ts. T., Glinskaya L. A., Fedorov K. N., Bazarova J. G. Synthesis and crystal structure of triple molybdate $\text{K}_5\text{InHf}(\text{MoO}_4)_6$. *Zhurnal neorganicheskoi khimii = Journal of Inorganic Chemistry*. 2005;50(8):1240–1243. (In Russian).

23. Bazarova J. G., Tushinova Yu. L., Logvinova A. V., Bazarov B. G., Dorzhieva S. G., Bazarova Ts. T. Synthesis, structure and properties of triple molybdates of the $\text{K}_5\text{RZr}(\text{MoO}_4)_6$ composition in K_2MoO_4 – $\text{R}_2(\text{MoO}_4)_3$ – $\text{Zr}(\text{MoO}_4)_2$ systems ($R = \text{trivalent elements}$). *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biokhimiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(2):202–211. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-202-211>.

24. Petrov K. I., Poloznikova M. E., Sharipov H. T., Fomichev V. V. *Vibrational spectra of molybdates and tungstates*. Tashkent: Fan; 1990.136 p. (In Russian).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ж. Г. Базарова,
д.х.н., профессор,
главный научный сотрудник,
Байкальский институт природопользования
СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
jbaz@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1231-0116>

А. В. Логвинова,
инженер,
Байкальский институт природопользования
СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация;
лаборант,
Бурятский государственный университет
им. Д. Банзарова,
670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а,
Российская Федерация,
logvinova_alexandra@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9850-2719>

Б. Г. Базаров,
д.ф.-м.н., доцент,
ведущий научный сотрудник,
Байкальский институт природопользования
СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация;
доцент,
Бурятский государственный университет
им. Д. Банзарова,
670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а,
Российская Федерация,
bazbg@rambler.ru; jbaz@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1712-6964>

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.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 07.10.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Jibzema G. Bazarova,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Chief Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
jbaz@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1231-0116>

Alexandra V. Logvinova,
Engineer,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation;
Laboratory Assistant,
Banzarov Buryat State University,
24a, Smolin St., Ulan-Ude, 670000,
Russian Federation;
logvinova_alexandra@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9850-2719>

Bair G. Bazarov,
Dr. Sci. (Physics and Mathematics),
Associate Professor, Leading Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation;
Associate Professor,
Banzarov Buryat State University,
24a, Smolin St., Ulan-Ude, 670000,
Russian Federation,
bazbg@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1712-6964>

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.*

Information about the article

The article was submitted 07.10.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.

Научная статья

УДК 66.001.13:66.002.62:66.004.8

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-517-522>



Реакционная способность 2,3-дихлорпропена в реакциях радикальной сополимеризации

Сергей Вячеславович Баданов, Андрей Васильевич Урумов,
Виктор Владимирович Баяндин, Нина Савельевна Шаглаева

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

Автор, ответственный за переписку: Баданов Сергей Вячеславович, badanov_sergei@mail.ru

Аннотация. Методом радикальной сополимеризации получены сополимеры 2,3-дихлорпропена с винилхлоридом, метилметакрилатом и со стиролом разного состава. Константы сополимеризации для сомономеров найдены из зависимости состава сополимера от содержания исходной смеси. Установлено, что увеличение содержания 2,3-дихлорпропена в исходной смеси для всех систем приводит к уменьшению выхода и характеристической вязкости сополимера. Оценка реакционной способности 2,3-дихлорпропена в сополимеризации проведена по обратной величине константы сополимеризации винилхлорида, метилметакрилата и стирола, которая показывает активность дихлорсодержащего мономера при взаимодействии с радикалами сомономеров. Установлено, что 2,3-дихлорпропен наиболее активен в реакции с радикалом стирола. Активность его с радикалом метилметакрилата уменьшается в 0,88 раз по сравнению с радикалом стирола. Самая низкая реакционная способность 2,3-дихлорпропена наблюдается при взаимодействии с радикалом винилхлорида. Синтезированные сополимеры являются перспективными соединениями для их дальнейшей модификации путем замещения атомов хлора на функциональные группы.

Ключевые слова: 2,3-дихлорпропен, винилхлорид, метилметакрилат, стирол, сополимеризация

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 19-08-00342 А).

Для цитирования: Баданов С. В., Урумов А. В., Баяндин В. В., Шаглаева Н. С. Реакционная способность 2,3-дихлорпропена в реакциях радикальной сополимеризации // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 517–522. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-517-522>.

CHEMICAL SCIENCES

Original article

Reactivity of 2,3-Dichloropropene in free-radical copolymerization reactions

Sergey V. Badanov, Andrey V. Urumov,
Victor V. Bayandin, Nina S. Shaglaeva

Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation,
Corresponding author: Sergey V. Badanov, badanov_sergei@mail.ru

Abstract. The copolymers of 2,3-Dichloropropene with vinyl chloride, methyl methacrylate, and styrene of different compositions were obtained via free-radical copolymerization. The copolymerization constants for the comonomers were found from the dependence of the copolymer composition on the initial mixture content. An increase in the content of 2,3-Dichloropropene in the initial mixture was found to decrease the yield and intrinsic viscosity of the copolymer for all systems. The reactivity of 2,3-Dichloropropene in copolymerization reactions was assessed according to the reciprocals of the copolymerization constants of vinyl chloride, methyl methacrylate, and styrene, which indicate the reactivity of the dichlorinated monomer when interacting with comonomer radicals. It was found that 2,3-dichloropropene is the most active in the reaction with a styrene radical. However, its reactivity with a methyl methacrylate radical decreases by a factor of 0.88 as compared to the styrene radical. The lowest reactivity of 2,3-Dichloropropene is observed when interacting with a vinyl chloride radical. The synthesized copolymers can be further modified by replacing chlorine atoms with functional groups.

Keywords: 2,3-Dichloropropene, vinyl chloride, methyl methacrylate, styrene, copolymerization

Funding. This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (project 19-08-00342/19).

For citation: Badanov S. V., Urumov A. V., Bayandin V. V., Shaglaeva N. S. Reactivity of 2,3-Dichloropropene in free-radical copolymerization reactions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):517-522. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-517-522>.

ВВЕДЕНИЕ

Высокомолекулярные хлорсодержащие соединения, прежде всего (со)полимеры на основе эпихлоргидрина, являются исходными соединениями для получения каучуков, синтетических волокон, разнообразных лаков и красок, полимерных композиционных материалов и других важных продуктов [1–7]. При промышленном способе производства хлорсодержащих мономеров методом хлорирования алкенов при повышенной температуре образуются нежелательные побочные продукты. Например, синтез эпихлоргидрина осуществляется хлорированием пропилена и сопровождается появлением значительного объема различных хлорсодержащих соединений [8–13].

Найдены способы переработки хлорорганических и серосодержащих отходов нефтехимии в полимерные серосодержащие продукты, которые могут применяться в качестве модификаторов поливинилхлоридных пластмасс, эпоксидных смол, нефтяных битумов, а также сорбентов ртути [14–19].

В работе [18] предложен удобный и простой способ получения 2,3-дихлорпропена (ДХП) из 1,2,3-трихлорпропана, который выделяется из хлорорганических отходов производства эпихлоргидрина. На основе ДХП синтезированы непредельные соли: N-(β-хлораллил)-N,N-диэтиламин, N-(β-хлораллил)-N,N,N-триэтиламмоний бромид и N,N-диметил-N,N-бис(β-хлораллил)аммоний хлорид [19]. Сополимеризацией ДХП с N,N-диметил-N,N-бис(β-хлораллил)аммоний хлоридом получены катионные полиэлектролиты, имеющие флокулирующие свойства [20].

Однако систематического изучения реакционной способности ДХП в сополимеризации с промышленными винильными мономерами до настоящего времени не проводилось. Поэтому целью настоящей работы являлось исследование реакционной способности ДХП в сополимеризации с винилхлоридом (ВХ), метилметакрилатом (ММА) и стиролом (СТ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение 1,2,3-трихлорпропана (ТХП) из хлорорганических отходов производства эпихлоргидрина. Удаление водорастворимых примесей из хлорорганических отходов осуществляли экстракцией воды, содержащей 2–3 г/л кальцинированной соды. Затем органическую фазу подвергали азеотропной сушке и путем

ректификации выделяли ТХП при температуре 156 °С. После повторной перегонки показатель преломления ТХП был равен 1,4854 (при температуре 25 °С).

Получение 2,3-дихлорпропена (ДХП). 1 моль ТХП обрабатывали 10%-м спиртовым раствором NaOH при комнатной температуре в течение 4 ч. При этом выпадал белый водорастворимый осадок (NaCl). После отделения осадка фильтрованием жидкую фазу подвергали перегонке и отбирали фракцию при температуре 94 °С. Выход ДХП – 80%. Строение ДХП доказывалось методами спектроскопии ИК, ЯМР ¹H и ¹³C. В спектре ЯМР ¹H ДХП содержатся сигналы протонов винильной группы при 5,48 м.д. и хлорметильной группы при 4,19 м.д. В спектре ЯМР ¹³C наблюдаются сигналы поглощения хлорметильной группы при 47,49 м.д., группы =CH₂ – при 116,44 м.д., и =CCl-группы – при 138,44 м.д. В ИК-спектре имеется полоса поглощения при 1605 см⁻¹, соответствующая винильной группе. Полоса поглощения связи C–Cl регистрируется при 680 см⁻¹.

Сополимеризация ДХП с ВХ, ММА и СТ. Сополимеризацию ДХП с ВХ, ММА и СТ проводили в условиях свободно-радикального инициирования под действием ДАК при температуре 60 °С. Заполнение ампул осуществляли гравиметрическим способом. В ампулы загружали ДХП, сомономер и инициатор, затем ампулы охлаждали, продували аргоном и затем отпаивали. Время сополимеризации – 6 ч. Охлажденные ампулы вскрывали. Полученные сополимеры растворяли в диметилсульфоксиде и осаждали гексаном. После многократного переосаждения сополимеры отфильтровывали и высушивали в вакуумном шкафу до постоянной массы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сополимеры ДХП с ВХ, ММА и СТ, полученные под действием динитрила азобисизомасляной кислоты, представляют собой порошкообразные или смолоподобные продукты, хорошо растворимые в ароматических углеводородах, четыреххлористом углероде, ацетоне, диметилформамиде и нерастворимые в воде и спиртах (табл. 1).

Протекание реакции сополимеризации ДХП с ВХ, ММА и СТ подтверждено кривыми турбидиметрического титрования, которые имеют плавную форму, соответствующую однокомпонентной структуре. В ИК-спектрах сополимеров

Таблица 1. Сополимеризация 2,3-дихлорпропена (M_1) с винилхлоридом, метилметакрилатом и стиролом (M_2)

Table 1. Copolymerization of 2,3-dichloropropene (M_1) with vinyl chloride, methyl methacrylate and styrene (M_2)

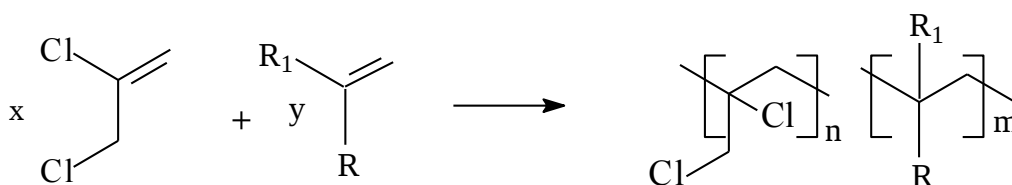
Номер экспери- мента	Состав исходной смеси, мол. %		Выход, %	Состав сополимера, мол. %		[η], дл/г*	Т _{разм.} , °С
	M ₁	M ₂		m ₁	m ₂		
ДХП-ВХ							
1	30	70	54	11,91	88,09	0,052	100-120
2	50	50	42	23,68	76,32	0,048	90-98
3	60	40	37	31,66	68,34	0,045	смолоподобные продукты
4	70	30	20	47,33	52,67	0,032	смолоподобные продукты
ДХП-ММА							
5	13	87	78,3	6,10	93,90	0,155	105-148
6	36	64	45,5	13,60	86,40	0,090	87-122
7	54	46	36,8	21,72	78,28	0,085	115-133
8	57	43	24,8	22,55	77,45	0,080	84-137
9	60	40	16,9	27,20	72,80	0,040	86-124
10	70	30	11,4	33,82	66,18	0,040	распл. на возд.
11	90	10	1.4	39,00	61,00	0,035	распл. на возд.
ДХП-СТ							
12	10	90	40,0	3,18	96,82	0,87	105-128
13	20	80	27,3	5,64	94,36	0,76	110-122
14	30	70	26,8	10,67	89,33	0,68	102-115
15	40	60	23,4	16,52	83,48	0,54	95-110
16	60	40	14,0	2,45	73,56	0,48	88-97
17	63	37	13,6	27,44	72,56	0,39	85-95
18	70	30	10,3	32,96	67,03	0,35	88-97
19	80	20	5,5	34,72	65,28	0,32	85-100
20	90	10	1.7	43,52	56,48	0,29	81-95

* $[\eta]$ – характеристическая вязкость.

отсутствуют полосы поглощения, характерные для винильной группы (980, 1580 и 1640 см^{-1}). Полосы поглощения полистирольных фрагментов в сополимере ДХП-СТ фиксируются в области 750, 760, 910, 3035, 3065, 3090 см^{-1} . Данные ИК-спектроскопии продукта реакции ДХП-ММА

свидетельствуют о наличии характеристических полос поглощения при 1465 ($\text{CH}_3\text{—O}$) и 1270 (C—O) см^{-1} .

Процесс сополимеризации ДХП с ВХ, ММА и СТ можно представить следующей схемой:



где R: C_6H_5 (I); COOCH_3 (II); Cl (III); R_1 : H (I, III); CH_3 (II).

Увеличение содержания ДХП в исходной смеси для всех систем приводит к уменьшению выхода и характеристической вязкости, $[\eta]$, сополимера. При содержании ВХ в исходной смеси ДХП-ВХ 70 мол. % получены порошки желтого цвета (см. табл. 1, эксперимент 1). Уменьшение количества ВХ в реакции ДХП с ВХ приводит к вязким «смолоподобным» продуктам (см. табл. 1, эксперименты 3 и 4).

Относительная реакционная способность ДХП в радикальной полимеризации оценена по величине, обратной константе сополимеризации ($1/r_1 = k_{12}/k_{11}$), так как M_1 является постоянным компонентом в ряду систем $M_1\text{—}M_2$. Численные значения $1/r_1$ показывают активность ДХП при

взаимодействии с радикалами второго мономера. Константы сополимеризации для сомономеров найдены из зависимости состава сополимера от содержания исходной смеси (см. табл. 1), их значения приведены в табл. 2.

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что ДХП наиболее активен в реакции с радикалом СТ. Его активность с радикалом ММА уменьшается в 0,88 раз по сравнению с радикалом СТ. Самая низкая реакционная способность ДХП наблюдается при взаимодействии с радикалом на основе ВХ и поэтому не представляет возможным получение твердых продуктов реакции при высоком содержании ДХП.

Таблица 2. Константы относительной реакционной способности 2,3-дихлорпропена (r_1) в сополимеризации с винилхлоридом, метилметакрилатом и стиролом (r_2)

Table 2. Relative reactivity constants of 2,3-dichloropropene (r_1) in copolymerization with vinyl chloride, methyl methacrylate and styrene (r_2)

Мономер	r_1	r_2	$r_1 \cdot r_2$	$1/r_1$
Винилхлорид	0,130	0,960	0,0100	1,04
Метилметакрилат	0,034	2,867	0,0976	2,41
Стирол	0,030	3,150	0,0945	33,33

ВЫВОДЫ

Исследована реакционная способность 2,3-дихлорпропена в радикальной сополимеризации с винилхлоридом, метилметакрилатом и стиролом.

Вычисленные константы сополимеризации свидетельствуют о низкой активности дихлорсодержащего мономера в реакциях перекрестного роста цепи.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Jin F.-L., Li X., Park S.-J. Synthesis and application of epoxy resins: A review // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2015. Vol. 29. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.03.026>.
- Hamed A. A., Saad G. R., Elsabee M. Z. Synthesis and characterization of modified epoxy resins and novel E-glass/spectra-reinforced composites // High Performance Polymers. 2016. Vol. 29, no. 3. P. 328–340. <https://doi.org/10.1177/0954008316643767>.
- Verma C., Olasunkanmi L. O., Akpan E. D., Quraishi M. A., Dagdag O., El Gouri M., et al. Epoxy resins as anticorrosive polymeric materials: A review // Reactive and Functional Polymers. 2020. Vol. 156, no. 1. P. 104741. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104741>.
- Lim Y. J., Han J., Kim H. W., Choi Y., Lee E., Kim Y. An epoxy-reinforced ceramic sheet as a durable solid electrolyte for solid state Na-ion batteries // Journal of Materials Chemistry A. 2020. Vol. 8, no. 29. P. 14528–14537. <https://doi.org/10.1039/d0ta06024k>.
- Montarnal D., Capelot M., Tournilhac F., Leibler L. Silica-like malleable materials from permanent organic networks // Science. 2011. Vol. 334, no. 6058. P. 965–968. <https://doi.org/10.1126/science.1212648>.
- Эпихлоргидрин: обзор мирового производства и рынка // Евразийский химический рынок. 2010. N 3. С. 2–7.
- Chen J., Chu N., Zhao M., Jin F.-L., Park S.-J. Synthesis and application of thermal latent initiators of epoxy resins: A review // Journal of Applied Polymer Science. 2020. Vol. 137, no. 48. P. 49592. <https://doi.org/10.1002/app.49592>.
- Рахманкулов Д. Л., Кимсанов Б. Х., Локтионов Н. А., Дмитриев Ю. К., Чанышев Р. Р. Эпихлоргидрин. Методы получения, физические и химические свойства, технология производства. М.: Химия, 2003. 244 с.
- Danov S. M., Sulimov A. V., Ovcharova A. V. Effect of technological parameters on the process of epichlorohydrin synthesis // Russian Journal of Applied Chemistry. 2012. Vol. 85, no. 1. P. 62–66. <https://doi.org/10.1134/S1070427212010120>.
- Li J., Zhao G., Gao S., Lv Y., Li J., Xi Z. Epoxidation of allyl chloride to epichlorohydrin by a reversible supported catalyst with H_2O_2 under solvent-free conditions // Organic Process Research and Development. 2006. Vol. 10, no. 5. P. 876–880. <https://doi.org/10.1021/op060108k>.
- Milchert E., Krzyżanowska A., Wołosiak-Hnat A., Paździoch W. The Influence of technological parameters on dehydrochlorination of dichloropropanols // Industrial and Engineering Chemistry Research. 2012. Vol. 51, no. 9. P. 3575–3579. <https://doi.org/10.1021/ie202630n>.
- Ding L., Yin J., Tong W., Peng R., Jiang J., Xu H., Wu P. Selective synthesis of epichlorohydrin via liquid-phase allyl chloride epoxidation over a modified Ti-MWW zeolite in a continuous slurry bed reactor // New Journal of Chemistry. 2021. Vol. 45, no. 1. P. 331–342. <https://doi.org/10.1039/d0nj04491a>.
- Шаглаева Н. С., Баяндин В. В., Пожидаев Ю. Н. Пути переработки хлорорганических отходов производства эпихлоргидрина // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2012. N 1 (2). С. 135–140.
- Воронков М. Г., Корчевин Н. А., Русская Н. В., Силинская Я. Н., Томин В. П., Дерягина Э. Н. Переработка отходов производства эпихлоргидрина в серорганические продукты и материалы // Химия в интересах устойчивого развития. 2001. Т. 9. N 5. С. 541–546.
- Воронков М. Г., Татарова Л. А., Трофимова К. С., Верхозина Е. И., Халиуллин А. К. Переработка промышленных хлор- и серосодержащих отходов // Химия в интересах устойчивого развития. 2001. Т. 9. N 3. С. 393–403.
- Чернышева Е. А., Грабельных В. А., Леванова Е. П., Корчевин Н. А. Применение серосодержащего сорбента на основе лигнина для извлечения ртути из водных растворов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7. N 3. С. 169–177. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-3-169-177>.
- Dmitriev Yu. K., Loktionov N. A., Sangalov Yu. A., Karchevskiy S. G., Maidanova I. O., Lakeev S. N. Thiokol-like polymers based on by-products of epichlorohydrin production // Chemistry for Sustainable Development. 2004. Vol. 12, no. 6. P. 657–662.
- Trofimova K. S., Dronov V. G., Shaglaeva N. S.,

Sultangareev R. G. New approach to processing of chlorine-containing wastes: Synthesis of 2,3-dichloropropene from 1,2,3-trichloropropane // *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2008. Vol. 81, no. 4. P. 730–731. <https://doi.org/10.1134/S1070427208040332>.

19. Shaglaeva N. S., Trofimova K. S., Sultangareev R. G., Dronov V. G., Zabanova E. A., Myachina G. F. Quaternary ammonium salts based on 2,3-dichloroprop-

1-ene // *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2010. Vol. 46, no. 3. P. 450–451. <https://doi.org/10.1134/S1070428010030267>.

20. Shaglaeva N. S., Bayandin V. V., Pozhidaev Y. N. Synthesis and properties of copolymers of N,N-dimethyl-N,N-bis(β-chloroallyl)ammonium chloride with acrylamide // *Russian Journal of General Chemistry*. 2015. Vol. 85, no. 7. P. 1721–1724. <https://doi.org/10.1134/s1070363215070257>.

REFERENCES

1. Jin F.-L., Li X., Park S.-J. Synthesis and application of epoxy resins: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2015;29:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.03.026>.

2. Hamed A. A., Saad G. R., Elsabee M. Z. Synthesis and characterization of modified epoxy resins and novel E-glass/spectra-reinforced composites. *High Performance Polymers*. 2016;29(3):328–340. <https://doi.org/10.1177/0954008316643767>.

3. Verma C., Olasunkanmi L. O., Akpan E. D., Quraishi M. A., Dagdag O., El Gouri M., et al. Epoxy resins as anticorrosive polymeric materials: A review. *Reactive and Functional Polymers*. 2020;156(1):104741. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104741>.

4. Lim Y. J., Han J., Kim H. W., Choi Y., Lee E., Kim Y. An epoxy-reinforced ceramic sheet as a durable solid electrolyte for solid state Na-ion batteries. *Journal of Materials Chemistry A*. 2020;8(29):14528–14537. <https://doi.org/10.1039/d0ta06024k>.

5. Montarnal D., Capelot M., Tournilhac F., Leibler L. Silica-like malleable materials from permanent organic networks. *Science*. 2011;33(6058):965–968. <https://doi.org/10.1126/science.1212648>.

6. Epichlorohydrin: review of world production and market. *Evraziiskii khimicheskii rynok = Eurasian chemical market*. 2010;3:2–7. (In Russian).

7. Chen J., Chu N., Zhao M., Jin F.-L., Park S.-J. Synthesis and application of thermal latent initiators of epoxy resins: A review. *Journal of Applied Polymer Science*. 2020;137(48):49592. <https://doi.org/10.1002/app.49592>.

8. Rakhmankulov D. L., Kimsanov B. Kh., Loktionov N. A., Dmitriev Yu. K., Chanyshv R. R. *Epichlorohydrin. Production methods, physical and chemical properties, production technology*. Moscow: Khimiya; 2003. 244 p. (In Russian)

9. Danov S. M., Sulimov A. V., Ovcharova A. V. Effect of technological parameters on the process of epichlorohydrin synthesis. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2012;85(1):62–66. <https://doi.org/10.1134/S1070427212010120>.

10. Li J., Zhao G., Gao S., Lv Y., Li J., Xi Z. Epoxidation of allyl chloride to epichlorohydrin by a reversible supported catalyst with H₂O₂ under solvent-free conditions. *Organic Process Research and Development*. 2006;10(5):876–880. <https://doi.org/10.1021/op060108k>.

11. Milchert E., Krzyżanowska A., Wołosiak-Hnat A., Paździoch W. The Influence of technologi-

cal parameters on dehydrochlorination of dichloropropanols. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2012;51(9):3575–3579. <https://doi.org/10.1021/ie202630n>.

12. Ding L., Yin J., Tong W., Peng R., Jiang J., Xu H., Wu P. Selective synthesis of epichlorohydrin via liquid-phase allyl chloride epoxidation over a modified Ti-MWW zeolite in a continuous slurry bed reactor. *New Journal of Chemistry*. 2021;45(1):331–342. <https://doi.org/10.1039/d0nj04491a>.

13. Shaglaeva N. S., Bayandin V. V., Pozhidaev Y. N. Ways of processing organochlorine wastes of epichlorohydrin production. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2012;1:135–140. (In Russian).

14. Voronkov M. G., Korchevin N. A., Russavskaya N. V., Silinskaya Ya. N., Tomin V. P., Deryagina E. N. Recycling of epichlorohydrin production waste into organosulfur products and materials. *Khimiya v interesakh ustoichivogo razvitiya = Chemistry for Sustainable Development*. 2001;9(5):541–546. (In Russian).

15. Voronkov M. G., Tatarova L. A., Trofimova K. S., Verkhozina E. I., Khaliullin A. K. Recycling of industrial chlorine- and sulfur-containing waste. *Khimiya v interesakh ustoichivogo razvitiya = Chemistry for Sustainable Development*. 2001;9(3):393–403. (In Russian).

16. Chernysheva E. A., Grabelnykh V. A., Levanova E. P., Korchevin N. A. The using of sulfur-containing lignin based sorbent for extraction of mercury from aqueous solutions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017;7(3):169–177. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-3-169-177>.

17. Dmitriev Yu. K., Loktionov N. A., Sangalov Yu. A., Karchevskiy S. G., Maidanova I. O., Lakeev S. N. Thiokol-like polymers based on by-products of epichlorohydrin production. *Chemistry for Sustainable Development*. 2004;12(6):657–662.

18. Trofimova K. S., Dronov V. G., Shaglaeva N. S., Sultangareev R. G. New approach to processing of chlorine-containing wastes: Synthesis of 2,3-dichloropropene from 1,2,3-trichloropropane. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2008;81(4):730–731. <https://doi.org/10.1134/S1070427208040332>.

19. Shaglaeva N. S., Trofimova K. S., Sultangareev R. G., Dronov V. G., Zabanova E. A., Myachina G. F. Quaternary ammonium salts based on 2,3-dichloroprop-

1-ene. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2010;46(3): 450–451. <https://doi.org/10.1134/S1070428010030267>.

20. Shaglaeva N. S., Bayandin V. V., Pozhidaev Y. N. Synthesis and properties of copolymers of N,N-dimethyl-

N,N-bis(β -chloroallyl)ammonium chloride with acrylamide. *Russian Journal of General Chemistry*. 2015;85(7): 1721–1724. <https://doi.org/10.1134/s1070363215070257>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

С. В. Баданов,

аспирант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
badanov_sergei@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2442-613X>

А. В. Урумов,

аспирант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
aurum1995@ya.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9967-9639>

В. В. Баяндин,

к.т.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
bayandinvv@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0999-6313>

Н. С. Шаглаева,

д.х.н., профессор,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
shaglaevans@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7889-0574>

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.*

Информация о статье

*Поступила в редакцию 18.05.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Sergey V. Badanov,

Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
badanov_sergei@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2442-613X>

Andrey V. Urumov,

Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: aurum1995@ya.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9967-9639>

Victor V. Bayandin,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor ,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
bayandinvv@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0999-6313>

Nina S. Shaglaeva,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
shaglaevans@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7889-0574>

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.*

Information about the article

*The article was submitted 18.05.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.*



Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils extracted from *Amomum muricarpum* Elmer from North Vietnam

Dau B. Thin*, Vu Q. Thanh**, Bui B. Thinh***

*Hong Duc University, Thanh Hoa, Vietnam

**Vietnam-Russia Tropical Center, Hanoi, Vietnam

***Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Corresponding author: Bui B. Thinh, buibaothinh9595@gmail.com

Abstract. Recent years have seen the development of bacterial resistance to currently available antibiotics, which necessitates a search for new antimicrobial agents. *Amomum muricarpum* Elmer is a widely used medicinal plant species in the genus *Amomum* (family Zingiberaceae) that is commonly found in Laos, the Philippines, China, and Vietnam. The present article describes the chemical composition and antimicrobial activity of essential oils extracted from the leaves and rhizomes of *A. muricarpum* from North Vietnam. The hydrodistilled essential oil was analyzed using gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, with the broth microdilution method designed to evaluate its antimicrobial efficacy. The absolute yield of essential oils amounted to 0.11% and 0.13% (v/w) for leaves and rhizomes, respectively, on a dry weight basis. It was found that the leaves and rhizomes of *A. muricarpum* produce oils abounding in monoterpenes. Of the total identified volatile components in the leaf oil (97.18%), three main constituents include α -pinene (40.45%), linalool (12.34%), and β -pinene (10.31%). In the rhizome oil, the main constituents include α -pinene (48.10%), β -pinene (20.32%), and linalool (7.56%) of the total identified volatile components (98.08%). An antimicrobial activity test indicates that essential oils from the leaves and rhizome of *A. muricarpum* inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 200 μ g/ml. In addition, the rhizome essential oil also exhibits antimicrobial activity against *Bacillus cereus* ATCC 14579, with a MIC value of 200 μ g/ml. The results indicate the potential of essential oils extracted from *A. muricarpum* as a source of antimicrobial agents.

Keywords: *Amomum muricarpum*, Zingiberaceae, essential oil, monoterpenes, α -pinene, antimicrobial activity

For citation: Thin D. B., Thanh V. Q., Thinh B. B. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils extracted from *Amomum muricarpum* Elmer from North Vietnam. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):523-530. (In English). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-523-530>.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 547.913

Химический состав и антимикробная активность эфирных масел *Amomum muricarpum* Elmer из Северного Вьетнама

Дау Ба Тхин*, Ву Куэт Тхань**, Буй Бао Тхинь***

*Университет Хонгдык, г. Тханьхоа, Вьетнам

**Российско-Вьетнамский Тропический центр, г. Ханой, Вьетнам

***Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Буй Бао Тхинь, buibaothinh9595@gmail.com

Аннотация. В последние годы развитие устойчивости бактерий к антибиотикам потребовало поиска новых противомикробных средств. *Amomum muricarpum* Elmer – это вид рода *Amomum* семейства Zingiberaceae (Имбирные), распространенный в Лаосе, Филиппинах, Китае и Вьетнаме, широко используемый как лекарственное растение. В данной статье описан химический состав и антимикробная активность эфирных масел из листьев и корневищ *A. muricarpum*, собранных в Северном Вьетнаме. Эфирное масло, полученное гидроdistилляцией, было проанализировано с использовани-

ем газовой хроматографии и газовой хроматографии-масс-спектрометрии, тогда как анализ с микроразбавлением бульона был разработан для оценки его антимикробной эффективности. Абсолютный выход эфирных масел составил 0,11% и 0,13% (об/масс.) соответственно для листьев и корневищ в пересчете на сухой вес. Анализ масел из листьев и корневищ *A. muricarpum* показал, что в масле преобладают монотерпены. В масле листьев из общего количества идентифицированных летучих компонентов (97,18%) три составляющих – α -пинен (40,45%), линалоол (12,34%) и β -пинен (10,31%), являлись основными. В масле корневища основными из общего количества идентифицированных летучих компонентов (98,08%) являлись следующие: α -пинен (48,10%), β -пинен (20,32%) и линалоол (7,56%). Тест на антимикробную активность показал, что эфирные масла из листьев и корневища *A. muricarpum* подавляют рост *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 со значением минимальной ингибирующей концентрации (МИК) 200 мкг/мл. Кроме того, эфирное масло корневища проявляло антимикробную активность и в отношении *Bacillus cereus* ATCC 14579 со значением МИК 200 мкг/мл. Результаты указывают на потенциал эфирных масел *A. muricarpum* как источника противомикробных агентов.

Ключевые слова: *Amomum muricarpum*, семейство Имбирные, эфирное масло, монотерпены, α -пинен, антимикробная активность

Для цитирования: Тхин Д. Б., Тхань В. К., Тхинь Б. Б. Химический состав и антимикробная активность эфирных масел *Amomum muricarpum* Elmer из Северного Вьетнама // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 523–530. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-523-530>.

INTRODUCTION

Since immemorial times, it has been known that the chemical constituents of essential oils of various plants are biologically and pharmacologically active natural substances [1, 2]. Therefore, greater attention has been paid to the screening of essential oils for their biological activity, as a source of developing new therapeutic agents for the prevention and amelioration of natural ailments caused by microorganisms [3, 4]. In continuation of our research on the chemical compounds and biological activities of essential oils from Vietnamese Zingiberaceae plants, we report our findings on the chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Amomum muricarpum*.

Amomum is a large genus in the Zingiberaceae family distributed in Asia, Africa, and Australia with about 180 species [5]. *Amomum* plants have been described as sources of biologically active components [4, 6–8]. *A. muricarpum* is a medicinal plant that can grow up to 2.5 m tall¹. Phytochemical investigation of *A. muricarpum* led to the identification of diarylheptanoids [9, 10]. Previously, the compositions and biological activities of essential oils from various parts of *A. muricarpum* from Central Vietnam were determined and reported [11–14]. Studies noted the effects of geographical and environmental factors, on the composition and quality of the essential oil [15–17]. This article will provide new data on the chemical composition and antimicrobial activity of essential oils extracted from *A. muricarpum*, which was grown in North Vietnam.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. The plant parts used for this study

namely the leaves and rhizomes of *A. muricarpum* were collected from Na Hang, Tuyen Quang Province, Northern Vietnam in July 2018. Botanical identification was performed by Assoc. Prof. Dr. Dau Ba Thin. Leaves and rhizomes of *A. muricarpum* were dried at room temperature (25 °C) for one week before hydrodistillation.

Hydrodistillation of essential oils. Essential oils were obtained from leaves and rhizomes of *A. muricarpum* (two kilogram for each extraction) by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus for 4 h at normal pressure according to the procedure of the Vietnamese Pharmacopoeia². The process of hydrodistillation using a Clevenger type apparatus has obtained a mixture of oil with a quantity of water. To remove water, the extracted essential oils were then dried by adding anhydrous sodium sulfate- Na_2SO_4 . The absorption of water into the sodium sulfate is complete in seconds, causing the grains to coagulate. If additional sodium sulfate is added, and the grains do not coagulate, then the oil is essentially anhydrous. The obtained oils were stored in dry amber vials at 4 °C until analysis. All measurements were performed in triplicate.

Analysis of essential oils. Gas chromatography (GC) analysis was performed on Agilent GC 7890A equipped with a FID and fitted with HP-5MS column (30 m $\times$ 0.25 mm, film thickness 0.25 μm , Agilent Technology). The analytical conditions were: carrier gas Helium (1 ml/min), injector temperature (PTV) 250 °C, detector temperature 260 °C, column temperature programmed from 60 °C (2 min hold) to 220 °C (10 min hold) at the heating rate 4 °C/min. Samples were injected by splitting and the split ratio was 10:1. The volume injected was 1.0 μL . Inlet pressure was 6.1 kPa.

¹Nguyen T.B. *Flora of Vietnam*. Vol. 1. Hanoi: Science and Technology Publishing House, 2000.

²Vietnamese Pharmacopoeia. Medical Publishing House, 2nd Edition, Hanoi, Vietnam, 2009.

An Agilent GC 7890A chromatograph fitted with a fused silica capillary HP-5MS column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 μm) and interfaced with a mass spectrometer HP 5973 MSD was used for the GC/MS analysis, under the same conditions as those used for GC analysis. The conditions were the same as described above with Helium (1 ml/min) as carrier gas. The MS conditions were as follows: ionization voltage 70 eV; emission current 40 mA; scan mass range of 35–350 amu at a sampling rate of 1.0 scan/s.

The identification of constituents from the GC/MS spectra of *A. muricarpum* was performed on the basis of retention indices (RI) determined with reference to a homologous series of *n*-alkanes, under identical experimental conditions, co-injection with standards (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or known essential oil constituents, MS library search³ and as described in previous studies [11–14].

Antimicrobial screening. Antimicrobial activity of *A. muricarpum* essential oil was carried out on three Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Salmonella enterica* ATCC 13076; three Gram-positive bacteria, *Enterococcus faecalis* ATCC 299212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and *Bacillus cereus* ATCC 14579; and the yeast, *Candida albicans* ATCC 10231, using the microdilution broth susceptibility assay as previously described [18]. Testing media included Mueller-Hinton Agar (MHA) used for bacteria and Sabouraud Agar (SA) used for fungi. The minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined as the lowest concentration of the test sample that completely inhibits the growth of microorganisms. All measurements were performed in triplicate.

Statistical analysis. All results of chemical composition and antimicrobial experiments were repeated three times and are expressed as mean ± standard deviation (SD).

RESULTS AND DISCUSSION

Yields and chemical constituents of essential oils. Hydrodistilled essential oils from the leaves and rhizomes of *A. muricarpum* are analyzed by GC/MS. The yields of the essential oils were 0.11 and 0.13% (v/w, ±0.01) respectively for the leaf and rhizome of *A. muricarpum*. All the essential oils were yellow coloured. The identities of the compounds of *A. muricarpum* oils, their per cent compositions and retention indices on HP-5MS column could be seen in Table 1.

A total of 45 compounds amounting to 97.18% in the *A. muricarpum* leaf essential oil were identified (Table 1). Among these 59.53% were monoterpene hydrocarbons, 17.71% were oxygenated monoterpenes, and it also contained 17.59% sesquiter-

pene hydrocarbons and 2.14% oxygenated sesquiterpenes. The major constituents in the *A. muricarpum* leaf essential oil were α-pinene (40.45%), linalool (12.34%), and β-pinene (10.31%). Comparing our results with those obtained by previous studies showed that all the leaf essential oils extracted are similar with α-pinene and β-pinene predominating [11–13]. However, although 1,8-cineole was the second major component in the previous studies [12, 13], this component was not detected in the leaf oil of *A. muricarpum* in the present study. Furthermore, linalool (12.34%) was found at relatively high amounts in the leaf oil of *A. muricarpum* in the present study (Table 1), while this component was in much lower amounts in the previous studies [12, 13]. The variations in chemical constituents can likely be attributed to the different geographical collection sites as well as climatic factors.

In the essential oil extracted from *A. muricarpum* rhizome, 44 compounds were identified, corresponding to 98.08% of the total oil (Table 1). It is comprised of monoterpene hydrocarbons (75.83%), oxygenated monoterpenes (10.76%), sesquiterpene hydrocarbons (10.52%), and oxygenated sesquiterpenes (0.81%). The main constituents in the *A. muricarpum* rhizome essential oil were α-pinene (48.10%), β-pinene (20.32%), and linalool (7.56%). To the best of our knowledge, there are several reports on the chemical composition of *A. muricarpum* rhizome oil [11–14]. Most of these reports indicate that α-pinene and β-pinene are the main and/or characteristic constituents of rhizome oil. The findings on the major components of *A. muricarpum* rhizome oil were in agreement with the previous reports except for linalool, which was found to be 7.56% in our study. As highlighted previously, this difference can also be attributed to growth, genetics, and climatic conditions.

Antimicrobial Activity. The antimicrobial activities of essential oils from the leaf and rhizome of *A. muricarpum* were estimated by means of the microdilution broth method and the results are expressed as the minimum inhibitory concentration (MIC) in Table 2. The rhizomes oil had moderate bactericidal activities against *S. aureus* and *B. cereus* with the MIC value of 200 μg/mL. The leaves oil only exhibited antimicrobial action against the growth of *S. aureus* with a MIC value of 200 μg/mL. The observed antimicrobial result of *A. muricarpum* essential oils was in agreement with previous information that *Amomum* essential oils from Vietnam and other parts of the world selectively inhibited the growth of different microorganisms [4, 6, 7, 14].

In general, the antibacterial activities of essential oils could be attributed to the most abundant components or the synergistic effects between its major components and minor ones in the oils

³National Institute of Science and Technology. NIST Chemistry Webbook // Data from NIST Standard Reference Database 69, 2018.

Table 1. Chemical constituents of essential oils from the leaves and rhizomes of *A. muricarpum*

Таблица 1. Химический состав эфирных масел из листьев и корневищ *A. muricarpum*

Compound name ^a	RI ^b	RI ^c	Percentage composition ^d	
			Leaves	Rhizomes
Tricyclene	928	927	0.15	0.21
α-Pinene	939	932	40.45	48.10
Camphene	955	954	1.15	0.96
β-Pinene	980	979	10.31	20.32
β-Myrcene	990	988	3.05	1.46
α-Phellandrene	1006	1003	0.42	0.22
δ-3-Carene	1010	1007	–	0.32
α-Terpinene	1017	1014	–	0.21
p-Cymene	1026	1020	0.15	–
β-Phellandrene	1028	1024	1.52	0.41
Limonene	1032	1024	0.45	0.23
1,8-Cineole	1035	1030	–	0.14
(Z)-β-Ocimene	1045	1032	0.17	–
(E)-β-Ocimene	1051	1044	–	0.23
γ-Terpinene	1061	1056	0.50	0.85
α-Terpinolene	1091	1086	1.21	2.31
Linalool	1100	1095	12.34	7.56
Borneol	1166	1165	0.21	0.30
Terpinen-4-ol	1177	1174	–	0.51
α-Terpineol	1189	1187	–	0.23
Fenchyl acetate	1228	1225	0.54	0.11
Geraniol	1253	1249	1.24	0.23
Bornyl acetate	1289	1287	0.12	0.56
Bicycloelemene	1327	1325	0.98	–
α-Cubebene	1351	1345	0.35	–
α-Copaene	1377	1374	0.62	0.59
Geranyl acetate	1381	1380	3.26	1.12
β-Bourbonene	1385	1384	–	0.28
β-Elemene	1391	1398	–	0.53
α-Gurjunene	1412	1409	0.13	0.11
β-Caryophyllene	1419	1417	1.95	0.72
α-Santalene	1427	1427	0.61	–
γ-Elemene	1430	1437	0.27	0.47
trans-α-Bergamotene	1435	1431	0.23	–
Aromadendrene	1441	1439	–	0.35
(Z)-β-Farnesene	1443	1440	0.56	0.89
α-Humulene	1454	1452	0.42	0.12
β-Santalene	1457	1457	–	0.15
Valencene	1473	1470	0.60	–
γ-Gurjunene	1477	1475	0.15	–
Germacrene D	1490	1484	0.27	0.89
α-Selinene	1493	1498	1.93	1.24
Bicyclogermacrene	1500	1500	3.47	0.95
(E,E)-α-Farnesene	1508	1505	2.24	1.22
γ-Cadinene	1514	1513	0.24	0.54
trans-γ-Bisabolene	1516	1514	0.21	0.14
α-Panasinsene	1518	1518	0.17	–
β-Sesquiphellandrene	1524	1521	0.56	–
δ-Cadinene	1525	1522	1.63	0.23
Calacorene	1546	1540	–	0.28
Germacrene B	1561	1559	–	0.84
(E)-Nerolidol	1563	1561	0.27	0.49
Spathulenol	1578	1577	0.31	–
Guaiol	1601	1601	0.34	–
α-Cadinol	1654	1652	0.52	–
(E,E)-Farnesol	1718	1718	0.70	0.32
Phytol	2125	2124	0.21	0.16
Total			97.18	98.08
Monoterpene hydrocarbons			59.53	75.83
Oxygenated monoterpenes			17.71	10.76
Sesquiterpene hydrocarbons			17.59	10.52
Oxygenated sesquiterpenes			2.14	0.81
Others			0.21	0.16

^aElution order on HP-5MS column; ^bRetention indices on HP-5MS column; ^cLiterature retention indices; ^dStandard deviation were insignificant and excluded from the Table to avoid congestion; “–” – Not identified.

Table 2. Antimicrobial activity of *A. muricarpum* essential oils

Таблица 2. Антимикробная активность эфирных масел *A. Muricarpum*

Microorganisms	Minimum inhibitory concentration (MIC, µg/mL)	
	Leaves	Rhizomes
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	na	na
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	na	na
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	na	na
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29912	na	na
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	200.0±0.231	200.0±0.147
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	na	200.0±0.325
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	na	na

Note: na – no activity.

[19, 20]. As mentioned above, α -pinene, β -pinene and linalool were found to be the most important components in the leaf and rhizome oils of *A. muricarpum*. The individual components the essential oils such as α -pinene, β -pinene and linalool have been determined for antimicrobial activity, and the results indicated that these compounds exhibited inhibitory effects against microorganisms [20–22]. In addition, the *A. muricarpum* essential oil showed better antimicrobial activity against the Gram-positive bacteria than the Gram-negative bacteria. According to previous studies, this is attributed to the existence of cell wall lipopolysaccharides in the Gram-negative bacteria, which can inhibit the hydrophobic essential oil constituents from diffusing into the cells [22, 23].

CONCLUSIONS

In summary, this study provides information on the chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from the leaves and rhizomes of *A. muricarpum*. According to GC/MS analyses the major components of leaf oil were α -pinene (40.45%), linalool (12.34%), and β -pinene (10.31%), while rhizome oil consists mainly of α -pinene (48.10%), β -pinene (20.32%), and linalool (7.56%). Also, these compounds may be thought of as the contributing factor to the observed antimicrobial activity of the essential oils against *S. aureus* and *B. cereus*. Thus, the *A. muricarpum* essential oils may be sources of promising antimicrobial agents.

REFERENCES

1. Ponce A. G., Del Valle C. E., Roura S. I. Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *LWT-Food Science and Technology*. 2004;37(2):199–204. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.07.005>.
2. Vergis J., Gokulakrishnan P., Agarwal R. K., Kumar A. Essential oils as natural food antimicrobial agents: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015;55(10):1320–1323. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.692127>.
3. Fokou J. B. H., Dongmo P. M. J., Boyom F. F. Essential oil's chemical composition and pharmacological properties. In: *Essential oils – oils of nature*. IntechOpen Publishers, U.K., 2020, pp. 1–23. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86573>.
4. Huong L. T., Linh L. D., Dai D. N., Ogunwande I. A. Chemical compositions and antimicrobial activity of essential oils from *Amomum velutinum* X. E. Ye, Škorníček. & N. H. Xia (Zingiberaceae) from Vietnam. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2020;23(5):1132–1141. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1856005>.
5. Lamxay V., Newman M. F. A revision of *Amomum* (Zingiberaceae) in Cambodia, Laos and Vietnam. *Edinburgh Journal of Botany*. 2012;69(1):99–206. <https://doi.org/10.1017/S0960428611000436>.
6. Huong L. T., Viet N. T., Sam L. N., Giang C. N., Hung N. H., Dai D. N., et al. Antimicrobial activity of the essential oils from the leaves and stems of *Amomum rubidum* Lamxay & N. S. Lý. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2021;20(1):81–89. <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.1.7>.
7. Huong L. T., Viet N. T., Sam L. N., Giang C. N., Hung N. H., Dai D. N., et al. Antimicrobial activity of essential oil from the rhizomes of *Amomum rubidum* growing in Vietnam. *American Journal of Essential Oil and Natural Products*. 2019;7(4):11–14.
8. Thinh B. B., Doudkin R. V., Thanh V. Q. Chemical composition of essential oil of *Amomum xanthioides* Wall. ex Baker from Northern Vietnam. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2021; 11(4):12275–12284. <https://doi.org/10.33263/BRIAC114.1227512284>.
9. Giang P. M., Son P. T., Matsunami K., Otsuka H. New Diarylheptanoids from *Amomum muricarpum* Elmer. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2006;54 (1):139–140. <https://doi.org/10.1248/cpb.54.139>.
10. Giang P. M., Son P. T., Matsunami K., Otsuka H. One new and several minor diarylheptanoids from *Amomum muricarpum*. *Natural Product Research*. 2012;26(13):1195–1200. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.545775>.
11. Huong L. T., Dai D. N., Thang T. D., Bach T. T., Ogunwande I. A. Volatile constituents of *Amomum maximum* Roxb and *Amomum microcarpum* C. F. Liang & D. Fang: two Zingiberaceae grown in Vietnam. *Natural Product Research*. 2015;29(15):1469–1472. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1003064>.
12. Huong L. T., Dai D. N., Binh N. Q., Chung M. V., Dung D. M. Constituents of essential oil from the *Amomum muricarpum* C.F. Liang & D. Fang in Vu

Quang National Park, Ha Tinh province. In: *Proceedings of the 2nd National Conference on the Vietnam Natural Museum System*, Hanoi, Vietnam; 2016. p. 452–457.

13. Thin D. B. Chemical Composition of Essential oils from the leaves and roots of *Amomum muricarpum* C.F. Liang & D. Fang in Ben En National Park, Thanh Hoa province. In: *Proceedings of the 7th National Scientific Conference of Ecology and Biological Resources*, Hanoi, Vietnam; 2017. p. 1484–1488.

14. Son N. T., Anh L. T., Thuy D. T. T., Luyen N. D., Tuyen T. T. Essential oils from the aerial part and rhizome of *Amomum muricarpum* Elmer and their antimicrobial activity. *Letters in Applied Nano-BioScience*. 2022;11(1):3322–3328. <https://doi.org/10.33263/LIANBS111.33223328>.

15. Hendawy S. F., Hussein M. S., El-Gohary A. E., Soliman W. S. Chemical constituents of essential oil in Chervil (*Anthriscus cerefolium* L. Hoffm.) cultivated in different locations. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2019;22(1):264–272. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1587316>.

16. Formisano C., Delfino S., Oliviero F., Tenore G. C., Rigano D., Senatore F. Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) collected in Molise (South-central Italy). *Industrial Crops and Products*. 2015;63:256–263. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.042>.

17. Elbali W., Djouahri A., Djerrad Z., Saka B., Aberrane S., Sabaou N., et al. Chemical variability and biological activities of *Marrubium vulgare* L. essential oil, depending on geographic variation and environmental factors. *Journal of Essential Oil Research*. 2018;30(6):470–487. <https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1493405>.

18. Thinh B. B., Doudkin R. V., Chac L. D., Chinh H. V., Hong N. T. M., Setzer W. N., et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from the Leaves and Stems of *Tinomiscium petiolare* Hook. f. & Thomson from Vietnam. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2021;24(3):461–468. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1936206>.

19. Dai D. N., Huong L. T., Hung N. H., Chinh H. V., Ogunwande I. A. Antimicrobial activity and chemical constituents of essential oil from the leaves of *Alpinia globosa* and *Alpinia tonkinensis*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2020;23(2):322–330. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1752816>.

20. Chen Z., He B., Zhou J., He D., Deng J., Zeng R.-H. Chemical compositions and antibacterial activities of essential oils extracted from *Alpinia guilinensis* against selected foodborne pathogens. *Industrial Crops and Products*. 2016;83:607–613. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.063>.

21. Aelenei P., Rimbu C. M., Guguianu E., Dimetriu G., Aprotosoiaie A. C., Brebu M., et al. Coriander essential oil and linalool–interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 2019;68(2):156–164. <https://doi.org/10.1111/lam.13100>.

22. Ghavam M., Manca M. L., Manconi M., Bacchetta G. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils obtained from leaves and flowers of *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Scientific Reports*. 2020;10(1). Article number 15647. 10 p. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73193-y>.

23. Salleh W. M. N. H. W., Ahmad F., Yen K. H., Sirat H. M. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Piper caninum* Blume. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(11):7720–7731. <https://doi.org/10.3390/ijms12117720>.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ponce A. G., Del Valle C. E., Roura S. I. Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables // *LWT-Food Science and Technology*. 2004. Vol. 37, no. 2. P. 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.07.005>.

2. Vergis J., Gokulakrishnan P., Agarwal R. K., Kumar A. Essential oils as natural food antimicrobial agents: a review // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015. Vol. 55, no. 10. P. 1320–1323. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.692127>.

3. Fokou J. B. H., Dongmo P. M. J., Boyom F. F. Essential oil's chemical composition and pharmacological properties. In: *Essential oils – oils of nature*. IntechOpen Publishers, U.K., 2020, pp. 1–23. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86573>.

4. Huong L. T., Linh L. D., Dai D. N., Ogunwande I. A. Chemical compositions and antimicrobial activity of essential oils from *Amomum velutinum* X. E. Ye, Škorníček. & N. H. Xia (Zingiberaceae) from

Vietnam // *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2020. Vol. 23, no. 5. P. 1132–1141. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1856005>.

5. Lamxay V., Newman M. F. A revision of *Amomum* (Zingiberaceae) in Cambodia, Laos and Vietnam // *Edinburgh Journal of Botany*. 2012. Vol. 69, no. 1. P. 99–206. <https://doi.org/10.1017/S0960428611000436>.

6. Huong L. T., Viet N. T., Sam L. N., Giang C. N., Hung N. H., Dai D. N., et al. Antimicrobial activity of the essential oils from the leaves and stems of *Amomum rubidum* Lamxay & N. S. Lý // *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2021. Vol. 20, no. 1. P. 81–89. <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.1.7>.

7. Huong L. T., Viet N. T., Sam L. N., Giang C. N., Hung N. H., Dai D. N., et al. Antimicrobial activity of essential oil from the rhizomes of *Amomum rubidum* growing in Vietnam // *American Journal of Essential*

Oil and Natural Products. 2019. Vol. 7, no. 4. P. 11–14.

8. Thinh B. B., Doudkin R. V., Thanh V. Q. Chemical composition of essential oil of *Amomum xanthioides* Wall. ex Baker from Northern Vietnam // Biointerface Research in Applied Chemistry. 2021. Vol. 11, no. 4. P. 12275–12284. <https://doi.org/10.33263/BRIAC114.1227512284>.

9. Giang P. M., Son P. T., Matsunami K., Otsuka H. New Diarylheptanoids from *Amomum muricarpum* Elmer // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 2006. Vol. 54, no. 1. P. 139–140. <https://doi.org/10.1248/cpb.54.139>.

10. Giang P. M., Son P. T., Matsunami K., Otsuka H. One new and several minor diarylheptanoids from *Amomum muricarpum* // Natural Product Research. 2012. Vol. 26, no. 13. P. 1195–1200. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.545775>.

11. Huong L. T., Dai D. N., Thang T. D., Bach T. T., Ogunwande I. A. Volatile constituents of *Amomum maximum* Roxb and *Amomum microcarpum* C. F. Liang & D. Fang: two Zingiberaceae grown in Vietnam // Natural Product Research. 2015. Vol. 29, no. 15. P. 1469–1472. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1003064>.

12. Huong L.T., Dai D.N., Binh N.Q., Chung M.V., Dung D.M. Constituents of essential oil from the *Amomum muricarpum* C.F. Liang & D. Fang in Vu Quang National Park, Ha Tinh province // Proceedings of the 2nd National Conference on the Vietnam Natural Museum System (Hanoi, Vietnam). 2016. P. 452–457.

13. Thin D.B. Chemical Composition of Essential oils from the leaves and roots of *Amomum muricarpum* C.F. Liang & D. Fang in Ben En National Park, Thanh Hoa province // Proceedings of the 7th National Scientific Conference of Ecology and Biological Resources (Hanoi, Vietnam). 2017. P. 1484–1488.

14. Son N. T., Anh L. T., Thuy D. T. T., Luyen N. D., Tuyen T. T. Essential oils from the aerial part and rhizome of *Amomum muricarpum* Elmer and their antimicrobial activity // Letters in Applied Nano-BioScience. 2022. Vol. 11, no. 1. P. 3322–3328. <https://doi.org/10.33263/LIANBS111.33223328>.

15. Hendawy S. F., Hussein M. S., El-Gohary A. E., Soliman W. S. Chemical constituents of essential oil in Chervil (*Anthriscus cerefolium* L. Hoffm.) cultivated in different locations // Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2019. Vol. 22, no. 1. P. 264–272. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1587316>.

16. Formisano C., Delfino S., Oliviero F., Tenore G. C., Rigano D., Senatore F. Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxi-

dative properties of essential oil and extracts of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) collected in Molise (South-central Italy) // Industrial Crops and Products. 2015. Vol. 63. P. 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.042>.

17. Elbali W., Djouahri A., Djerrad Z., Saka B., Abergane S., Sabaou N., et al. Chemical variability and biological activities of *Marrubium vulgare* L. essential oil, depending on geographic variation and environmental factors // Journal of Essential Oil Research. 2018. Vol. 30, no. 6. P. 470–487. <https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1493405>.

18. Thinh B. B., Doudkin R. V., Chac L. D., Chinh H. V., Hong N. T. M., Setzer W. N., et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from the Leaves and Stems of *Tinomiscium petiolare* Hook. f. & Thomson from Vietnam // Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2021. Vol. 24, no. 3. P. 461–468. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1936206>.

19. Dai D. N., Huong L. T., Hung N. H., Chinh H. V., Ogunwande I. A. Antimicrobial activity and chemical constituents of essential oil from the leaves of *Alpinia globosa* and *Alpinia tonkinensis* // Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2020. Vol. 23, no. 2. P. 322–330. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1752816>.

20. Chen Z., He B., Zhou J., He D., Deng J., Zeng R.-H. Chemical compositions and antibacterial activities of essential oils extracted from *Alpinia guilinensis* against selected foodborne pathogens // Industrial Crops and Products. 2016. Vol. 83. P. 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.063>.

21. Aelenei P., Rimbu C. M., Guguianu E., Dimetriu G., Aprotosoiaie A. C., Brebu M., et al. Coriander essential oil and linalool–interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria // Letters in Applied Microbiology. 2019. Vol. 68, no. 2. P. 156–164. <https://doi.org/10.1111/lam.13100>.

22. Ghavam M., Manca M. L., Manconi M., Bacchetta G. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils obtained from leaves and flowers of *Salvia hydrangea* DC. ex Benth // Scientific Reports. 2020. Vol. 10, no. 1. Article number 15647. 10 p. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73193-y>.

23. Salleh W. M. N. H. W., Ahmad F., Yen K. H., Sirat H. M. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Piper caninum* Blume // International Journal of Molecular Sciences. 2011. Vol. 12, no. 11. P. 7720–7731. <https://doi.org/10.3390/ijms12117720>.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Dau B. Thin,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Hong Duc University,
565, Quang Trung St., Thanh Hoa, 40130,
Vietnam,
<https://orcid.org/0000-0002-6351-3335>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Дау Ба Тхин,
к.б.н., доцент,
Университет Хонгдук,
40130, г. Тханьхоа, ул. Куанг Чунг, 565,
Вьетнам,
<https://orcid.org/0000-0002-6351-3335>

Vu Q. Thanh,
Researcher,
Vietnam-Russia Tropical Center,
Nguyen Van Huyen St., Hanoi, 11300,
Vietnam,
<https://orcid.org/0000-0002-8783-9014>

Bui B. Thinh,
Researcher,
Far Eastern Federal University,
10, Ajax Bay, Russky Island,
Vladivostok, 690922,
Russian Federation,
buibaothinh9595@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3826-1199>

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.

Information about the article

The article was submitted 05.10.2021.

Approved after reviewing 15.11.2021.

Accepted for publication 30.11.2021.

Бу Куэт Тхань,
научный сотрудник,
Российско-Вьетнамский Тропический центр,
11300, г. Ханой, ул. Нгуен Ван Хуен,
Вьетнам,
<https://orcid.org/0000-0002-8783-9014>

Буй Бао Тхинь,
научный сотрудник,
Дальневосточный федеральный университет,
690922, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10,
Российская Федерация,
buibaothinh9595@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3826-1199>

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.

Информация о статье

Поступила в редакцию 05.10.2021.

Одобрена после рецензирования 15.11.2021.

Принята к публикации 30.11.2021.

Original article

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-531-539>



Synthesis and crystal structure of cytotoxic copper(II) complex with 1,10-phenanthroline-5,6-dione and isothiazole derivative

Yuliya A. Golubeva*, Ksenia S. Smirnova*, Lubov' S. Klyushova**, Vladimir I. Potkin***, Elizaveta V. Lider*

*Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, SB RAS,
Novosibirsk, Russian Federation

**Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center for Fundamental
and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

***Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Belarus

Corresponding author: Elizaveta V. Lider, lidalider@ngs.ru

Abstract. Oligopyridine based copper(II) complexes are of interest to scientists as possible anticancer agents due to promising cytotoxic and DNA binding/cleaving properties. In this study, copper(II) complex $[\text{Cu}(\text{phendione})\text{L}_2] \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ with 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione) and 4,5-dichloro-isothiazole-3-carboxylic acid (HL) was synthesized and characterized by elemental analysis, IR-spectroscopy, X-ray powder diffraction and single-crystal X-ray diffraction. According to X-ray diffraction data, obtained compound is mononuclear complex with square pyramidal coordination environment of the central atom which is surrounded by two isothiazolate molecules and one phendione ligand. The X-ray diffraction data are confirmed by IR-spectroscopy data showing the presence of characteristic stretching vibration bands of the carbonyl and carboxyl groups of oligopyridine ligand and isothiazolate ions, respectively. Density functional theory (DFT) calculations for complex were carried out using the ADF software package to perform geometry optimization and frequency calculations that were in a good agreement with experimental IR spectrum. Cytotoxicity of complex and initial reagents was tested in vitro against HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and MCF-7 (human breast adenocarcinoma) cell lines. The complex showed high dose-dependent cytotoxic activity with the IC_{50} values of $0.60 \pm 0.03 \mu\text{M}$ and $0.96 \pm 0.13 \mu\text{M}$, respectively, which is higher than the activity of cisplatin against these cell lines. The activity of the complex is due to the presence of phendione ligand, which exhibits a similar cytotoxic activity.

Key words: copper complex, isothiazole, crystal structure, phenanthroline, cytotoxicity

Acknowledgments. The authors thank A. P. Zubareva and N. N. Komardina for the elemental analysis, A. O. Matveeva for the X-ray phase analysis data, T. S. Sukhikh for providing the data collected in XRD Facility of NIIC SB RAS. The work was performed using the equipment of the Center for Collective Use "Proteomic Analysis", supported by funding from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement no. 075-15-2021-691).

Funding. The reported study was funded by RFBR (project no. 20-33-90092).

The research (Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry SB RAS) was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (no. 121031700321-3).

For citation: Golubeva Yu. A., Smirnova K. S., Klyushova L. S., Potkin V. I., Lider E. V. Synthesis and crystal structure of cytotoxic copper(II) complex with 1,10-phenanthroline-5,6-dione and isothiazole derivative. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):531-539. (In English). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-531-539>.

Синтез и кристаллическая структура цитотоксического комплекса меди(II) с 1,10-фенантролин-5,6-дионом и производным изотиазола

Юлия Андреевна Голубева*, Ксения Сергеевна Смирнова *,
Любовь Сергеевна Ключова **, Владимир Иванович Поткин ***,
Елизавета Викторовна Лидер *

*Институт неорганической химии им. А. В. Николаева СО РАН,
г. Новосибирск, Российская Федерация

**Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики – структурное
подразделение Федерального исследовательского центра фундаментальной
и трансляционной медицины, г. Новосибирск, Российская Федерация

***Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси,
г. Минск, Беларусь

Автор, ответственный за переписку: Лидер Елизавета Викторовна, lisalider@ngs.ru

Аннотация. Комплексы меди(II) на основе олигопиридинов привлекают интерес исследователей в качестве возможных противоопухолевых агентов ввиду их выдающихся цитотоксических свойств и способности связываться/расщеплять ДНК. В настоящем исследовании был получен и охарактеризован с помощью ИК-спектроскопии, элементного, рентгенофазового и рентгеноструктурного анализа комплекс меди(II) с 1,10-фенантролин-5,6-дионом (phendione) и 4,5-дихлор-изотиазол-3-карбоновой кислотой, $[\text{Cu}(\text{phendione})\text{L}_2] \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, полученное соединение является мооядерным, при этом две молекулы изотиазола и 1,10-фенантролин-5,6-дион образуют квадратно-пирамидальное окружение центрального атома. Данные рентгеноструктурного анализа согласуются с данными ИК-спектроскопии, указывающими на наличие характеристичных полос валентных колебаний карбонильной и карбоксильной групп олигопиридина и производного изотиазола соответственно. Расчеты, выполненные методом теории функционала плотности (DFT) с использованием программного пакета ADF, позволили оптимизировать геометрию комплекса и вычислить теоретический ИК-спектр, который хорошо согласуется с экспериментальным. Цитотоксичность комплексов и исходных реагентов исследована на клеточных линиях HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома) и MCF-7 (аденокарцинома молочной железы). Комплекс проявляет высокую дозозависимую цитотоксическую активность, при этом значения параметра IC_{50} составляют $0,60 \pm 0,03$ мкМ (HepG2) и $0,96 \pm 0,13$ мкМ (MCF-7), что превышает активность цисплатина по отношению к данным клеточным линиям. Активность комплекса обусловлена присутствием лиганда phendione, который в свободном виде также обладает токсичностью.

Ключевые слова: комплекс меди, изотиазол, кристаллическая структура, фенантролин, цитотоксичность

Благодарности. Авторы выражают благодарность А. П. Зубаревой и Н. Н. Комардиной за предоставление данных элементного анализа, А. О. Матвеевой – за предоставление данных рентгенофазового анализа, Т. С. Сухих – за предоставление данных, измеренных в рентгенодифракционном ЦКП ИНХ СО РАН.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-33-90092.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

Для цитирования: Голубева Ю. А., Смирнова К. С., Ключова Л. С., Поткин В. И., Лидер Е. В. Синтез и кристаллическая структура цитотоксического комплекса меди(II) с 1,10-фенантролин-5,6-дионом и производным изотиазола // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 531–539. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-531-539>.

INTRODUCTION

Currently, mixed-ligand complexes of essential metals with 1,10-phenanthroline and its derivatives are being actively studied *in vitro* and *in vivo* for their biological properties (cytotoxic, antioxidant, antibacterial, antiviral and other activities) [1–7]. Essential metals include such microelements as iron, copper, zinc, cobalt, nickel, manganese and some other metals. Among the complexes of essential metals, the most interesting as anticancer agents are 1,10-phenanthroline based copper(II) complexes, since they are capable to interact and cleave DNA/RNA backbone [8, 9]. Moreover, oligopyridine and amino acid/acetylacetone based copper(II) complexes (Casiopéinas) have shown antiproliferative, genotoxic, and antineoplastic activity [10, 11]. The most promising complexes from the Casiopeinas series have completed preclinical trials [12]. Besides amino acids, N-donor systems (terpyridine, imidazole, benzimidazole, tetrazole), O-donor systems (salicylic acid, dicarboxylic acids), S-donor systems (thiosemicarbazones, dithiocarbamates, thioureas), Schiff bases are often used as secondary ligand in synthesis of cytotoxic Casiopeinas-like complexes [6]. The isothiazole heterocycles and coordination compounds with isothiazoles have been shown to be bioactive substances with pesticidal, anticancer, anti-inflammatory and antiviral activities [13]. However, despite their promising properties, isothiazoles are negligibly used for the synthesis of bioactive oligopyridine based complexes with essential metals. Thus, the research aiming preparation of corresponding complexes may be indeed promising from the point of view of medicinal chemistry.

In continuation of our work [14] in order to expand the number of available cytotoxic oligopyridine based complexes with isothiazole as secondary ligand, the present study set out to synthesise new mixed-ligand copper(II) complex with 1,10-phenanthroline-5,6-dione and 4,5-dichloro-isothiazole-3-carboxylic acid and evaluate its biological activity.

EXPERIMENTAL SECTION

1,10-Phenanthroline-5,6-dione (phendione) was acquired from ABCR (Germany). 4,5-Dichloro-isothiazole-3-carboxylic acid (HL) was synthesized as previously described [15, 16]. Solvents and reagents were used as purchased without any further purification.

Elemental analysis (C, H, N) was performed using Euro EA 3000 analyzer. IR absorption spectra were recorded on SCIMITAR FTS 2000 and VERTEX-80 spectrophotometers at 4000–400 cm⁻¹ (in fluorinated oil – in the region of 4000–1500 cm⁻¹, in vaseline oil – 1800–400 cm⁻¹). Powder XRD analysis of complexes was performed on a Shimadzu XRD-7000 diffractometer (CuK α radiation, Ni filter, 3–40° 2 θ range, 0.03° 2 θ step, room temperature).

Quantum-chemical calculations were carried out on the computational cluster of NIIC SB RAS using the Amsterdam Density Functional (ADF) program by dint of density functional theory (DFT)¹. The generalized gradient approximation (GGA), the density functional PBE (Perdew – Burke – Ernzerhof) [17] in combination with the all electron basis set TZ2P [18] were applied. The calculations were carried out for non-solvent system.

Bruker D8 Venture diffractometer with the graphite-monochromated MoK α radiation (λ = 0.71073 Å) was utilized to collect single-crystal XRD data for copper(II) complex. All measurements were carried out at 150 K, and the ϕ - and ω -scan techniques were employed. Absorption corrections were applied with the SADABS program². The crystal structure was solved and refined by means of the SHELXT [19] and SHELXL [20] programs using OLEX2 GUI [21]. Atomic thermal displacement parameters for non-hydrogen atoms were refined anisotropically. Positions of hydrogen atoms were calculated according to their geometrical conditions and refined by dint of the riding model. The crystallographic data and details of the structure refinements are shown in Table 1. CCDC 2121029 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These information can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Center at <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/>.

Synthesis of [Cu(phendione)L₂] $\cdot$ C₂H₅OH. [Cu(H₂O)L₂] was synthesized as previously described [14]. The precipitate of [Cu(H₂O)L₂] (0.048 g, 0.10 mmol) was resuspended in mixture of ethanol (2 ml) and dichloromethane (3 ml). Solid phendione (0.025 g, 0.12 mmol) was added to suspension with stirring. The reaction mixture became clear, precipitate dissolved. The solution was left for slow evaporation at room temperature. Polycrystalline phase was obtained after a week. Green crystals were filtered out, washed with ethanol and dried in air. Yield: 0.064 g (90%). Elemental analysis (%): Calc. for C₂₂H₁₂Cl₄CuN₄O₇S₂: C, 37.0; H, 1.7; N, 7.8. Found: C, 37.3; H, 1.8; N, 7.7.

Cytotoxic activity. Human hepatocellular carcinoma (HepG2) and human breast adenocarcinoma (MCF-7) cell lines were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplemented with a 10% fetal bovine serum under a humidified atmosphere (5% CO₂ and 95% air) at 37 °C. Cell viability was evaluated by Hoechst/PI staining as previously described [22]. Hep2 cells were cultured to 96-well plates at a density 5 $\cdot$ 10³ cells per well. After 24 hours cells were treated with complex dissolved in DMSO and incubated for 48 hours. Serial dilutions were prepared in IMDM medium in the concentration range of 0.1–25 μ M. For identification of live, apoptotic and dead cells, treated cells and control cells were stained with a mixture of fluorescent dyes

¹ADF2013, Software for Chemistry & Materials, Theoretical Chemistry, Vrije Universiteit, Amsterdam (The Netherlands), 2013.

²Bruker Apex3 software suite: Apex3, SADABS-2016/2 and SAINT, version 2018.7-2; Bruker AXS Inc.: Madison, WI, 2017.

Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) and propidium iodide (Invitrogen) for 30 min at 37 °C. An IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare, UK) was used to perform automatic imaging of four fields per well under 200× magnification, in bright field and fluorescence channels. The IN Cell Investigator image analysis software (GE Healthcare, UK) was used to determine live, apoptotic and dead cells among the whole population. All data shown are mean of three wells. The quantitative data were expressed as the mean ± standard deviation (SD). All statistical analyses were performed using the software Excel 2016 (Microsoft) and Origin 8.0.

Table 1. Crystallographic data of the copper(II) complex

Таблица 1. Кристаллографические данные для комплекса меди(II))

Parameter	Value
Empirical formula	C ₂₂ H ₁₂ Cl ₄ N ₄ O ₇ S ₂ Cu
Formula weight	713.82
Crystal system, space group	Monoclinic, P21/c
Temperature (K)	150
a/Å	11.2744(15)
b/Å	8.5017(11)
c/Å	28.481(3)
α/°	90
β/°	94.024(5)
γ/°	90
Volume/Å ³	2723.2(6)
Z	4
ρ _{calc} g/cm ³	1.741
μ/mm ⁻¹	1.399
Crystal size/mm	0.3 × 0.2 × 0.12
2θ range	4.774 to 51.486
for data collection/°	
Index ranges	-13 ≤ h ≤ 7, -10 ≤ k ≤ 10, -33 ≤ l ≤ 34
Reflections collected	34013
Independent reflections	5030 [R _{int} = 0.0520, R _{sigma} = 0.0398]
Restraints/parameters	0/363
Goodness-of-fit on F ²	1.088
Final R indexes [I > 2σ (I)]	R ₁ = 0.0423, wR ₂ = 0.0921
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.0554, wR ₂ = 0.0971
Largest diff. peak/hole / e/Å ⁻³	0.75/-0.41

RESULTS AND DISCUSSION

Green crystals of copper(II) complex [Cu(phendione)L₂]·C₂H₅OH were obtained after slow evaporation of ethanol/dichloromethane (1:1.5 by volume) solution containing [Cu(H₂O)L₂] and phendione ligand in 1:1.2 molar ratio. Obtained complex is soluble in DMSO, CH₃CN, sparingly soluble in ethanol, CH₂Cl₂ and practically insoluble in water. The elemental analysis results for [Cu(phendione)L₂]·C₂H₅OH are consistent with the proposed formula of the complex. The presence of solvent ethanol molecule was confirmed by IR-spectroscopy (ν(OH) = 3464, 3308 cm⁻¹). Powder X-ray diffraction analysis have been used to demonstrate the identity of single crystal and the synthesized polycrystalline phase of complex which

proved the phase purity of the bulk sample (Fig. 1).

According to single-crystal X-ray diffraction data, the copper(II) complex [Cu(phendione)L₂]·C₂H₅OH reveals square pyramidal coordination environment of central atom. The coordination sphere of Cu(II) consists of two O atoms of the isothiazoles carboxylates, one N of the isothiazole ligand and two N atoms of the phendione (Fig. 2). Additional contact (of 2.772 Å) is observed between the copper(II) and the O atom of the isothiazole moiety giving distorted octahedral 5 + 1 environment. Also there is outer-sphere ethanol molecule. Similar structure has been observed in our previous work, where bipicoline has been used instead of phendione [14].

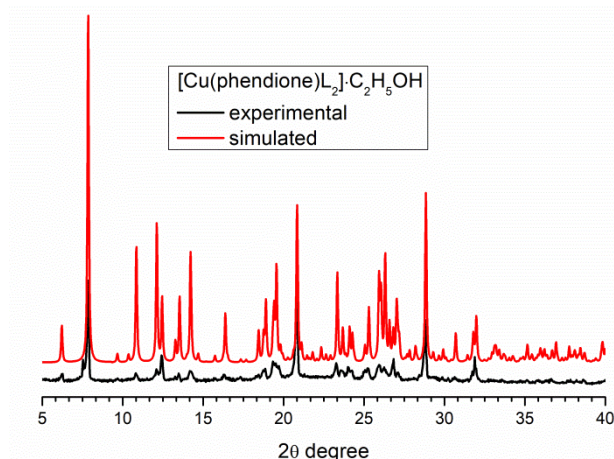


Fig. 1. X-ray powder patterns for [Cu(phendione)L₂]·C₂H₅OH

Рис. 1. Дифрактограмма для [Cu(phendione)L₂]·C₂H₅OH

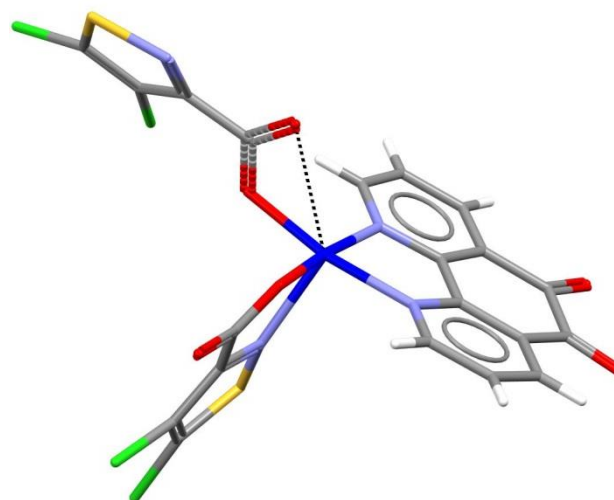


Fig. 2. Structure of [Cu(phendione)L₂] complex (Solvent ethanol molecule is not shown)

Рис. 2. Структура комплекса [Cu(phendione)L₂] (молекула растворителя не показана)

DFT-calculations, such as IR-frequencies and energies of HOMO/LUMO, have been carried out for copper(II) complex. The highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest-lying unoccupied molecular orbital (LUMO) are known to be the most im-

portant orbitals in a molecule. In case of copper(II) complex, the electron density of HOMO (Fig. 3) is concentrated on phendione mainly and energy of this orbital is equal to -5.978 eV. LUMO (-4,997 eV) is disposed on copper ion and donor atoms of its coordination sphere. The energy gap between HOMO and LUMO ($E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$) is -0.981 eV. A molecule with large HOMO–LUMO gap is described as a hard molecule which is much less polarizable. In contrast, the soft systems have small HOMO–LUMO gap and are highly polarizable [23]. Thus, complex refers to soft molecules due to the small value of energy gap.

Vibrational spectrum has been calculated for the complex with optimized geometry. There are no imaginary frequencies in the obtained spectrum, consequently, the geometry corresponds to local minima. The main vibrational frequencies of calculated and experimental spectra are shown in Table 2. The vibrations of characteristic groups (COO–, C–H, C–Cl, O=C–C=O) exhibit in both spectra. The slight shift and broadening of bands is observed in experimental IR-spectrum, which can be due to the presence of ethanol molecule in system. Despite these small differences spectra are in a good agreement.

The obtained IR-spectrum clearly indicates the formation of copper(II) complex. There is a disappearing of broad $\nu(\text{O–H})$ band observed in the HL spectrum (2915 cm^{-1}) in the result of ligand deprotonation during the synthesis. Moreover, the bands of asymmetrical stretching vibrations of the carboxylate group shift to the low-frequency region ($1651\text{--}1614 \text{ cm}^{-1}$) in contrast to the band in HL spectrum ($\nu(\text{COO})_{\text{as}} = 1724 \text{ cm}^{-1}$).

The cytotoxicity of copper(II) complex was tested by Hoechst/PI staining on HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and MCF-7 (human breast adenocarcinoma) cell lines by exposing them for 48 h to the medium containing the compound in $0.1\text{--}25 \text{ }\mu\text{M}$ concentration. The concentration-dependent cell viability graphs are given in Fig. 4. Calculated from these graphs IC_{50} values (concentration required to reduce survival in the cell lines to 50%) are summarized in Table 3.

Earlier, copper acetate and HL were shown to be nontoxic in the concentration range of $1\text{--}50 \text{ }\mu\text{M}$ [14]. At the same time, 1,10-phenanthroline-5,6-dione is highly toxic to HepG2 and MCF-7 cells with IC_{50} values being in the nanomolar concentration range [24].

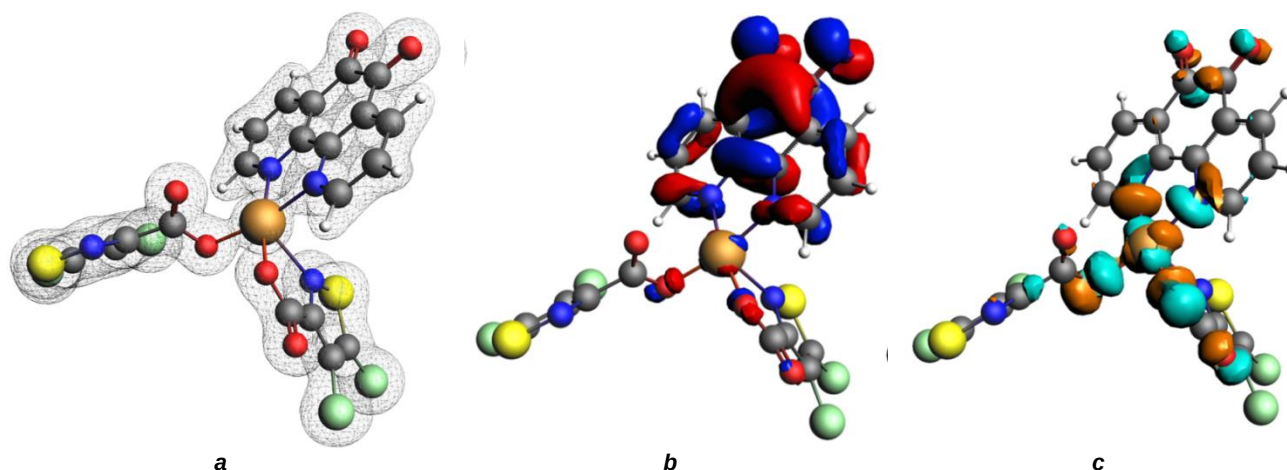


Fig. 3. Electron density of $[\text{Cu}(\text{phendione})\text{L}_2]$ (a), HOMO (b) and LUMO (c)

Рис. 3. Электронная плотность $[\text{Cu}(\text{phendione})\text{L}_2]$ (a), ВЗМО (b) и НСМО (c)

Table 2. Calculated and experimental vibrational frequencies (cm^{-1}) of $[\text{Cu}(\text{phendione})\text{L}_2]$

Таблица 2. Теоретически рассчитанные и экспериментальные колебательные частоты (cm^{-1}) комплекса $[\text{Cu}(\text{phendione})\text{L}_2]$

Assignment, cm^{-1}	DFT-calculation	Experimental data
$\nu(\text{O–H})_{\text{EtOH}}$	–	3464, 3308
$\nu(\text{C–H})$	3130, 3115, 3106	3101, 3086, 3061
$\nu(\text{C–H})_{\text{EtOH}}$	–	2960, 2924, 2856
$\nu(\text{O=C–C=O})_{\text{as}}$	1692	1726
$\nu(\text{O=C–C=O})_{\text{s}}$	1664	1710
$\nu(\text{COO})_{\text{as}}$	1642, 1628	1651, 1614
$\nu(\text{COO})_{\text{s}}$	1261	1261
$\nu(\text{C–Cl})$	1055, 1044	1049, 1024
$\text{R}_{\text{rings}}, \delta(\text{C–H})$	1578, 1560, 1412, 1306, 1195, 1114, 979, 942	1576, 1408, 1300, 1205, 1128, 972

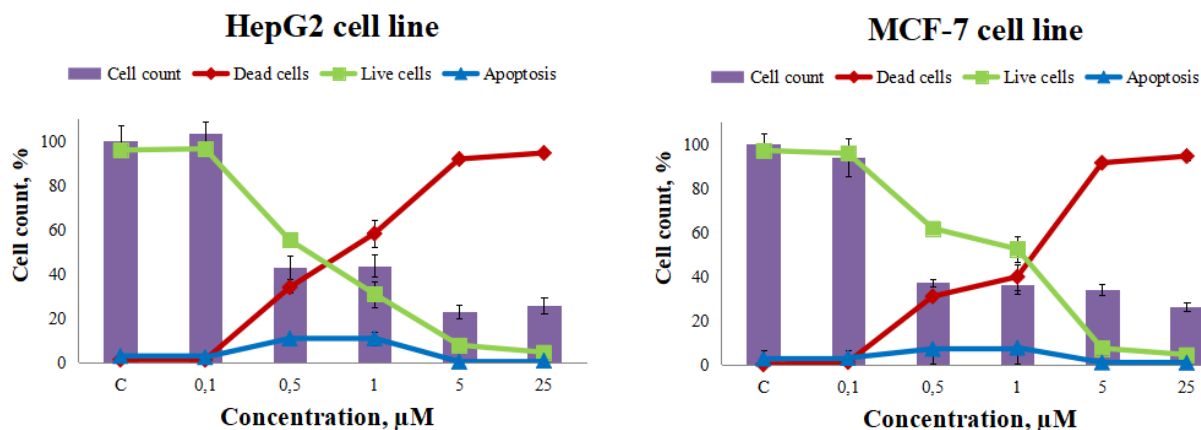


Fig. 4. Effect of $[\text{Cu}(\text{phendione})\text{L}_2] \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ on the viability of HepG2 and MCF-7 cells

Рис. 4. Эффект воздействия $[\text{Cu}(\text{phendione})\text{L}_2] \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ на выживаемость клеток HepG2 и MCF-7

According to cytotoxicity study of $[\text{Cu}(\text{phendione})\text{L}_2] \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, complex possesses dose-dependent cytotoxicity against both cell lines ($\text{IC}_{50} = 0.96 \pm 0.13 \mu\text{M}$ (MCF-7), $0.60 \pm 0.03 \mu\text{M}$ (HepG2)), while its toxicity is higher than that of oligopyridine on HepG2 cells and vice versa on MCF-7 cells (See Table 3). Thus, the activity of the complex is due to the presence of phendione ligand, which exhibits a similar cytotoxic activity. The activity of the obtained complex exceeds the

activity of cisplatin by more than an order of magnitude.

This compound is part of a series of mixed-ligand copper(II) complexes with HL and various oligopyridines, and turned out to be the most toxic in this series. So, for example, the IC_{50} value against MCF-7 cells in the same conditions is $1.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$ for $[\text{Cu}(4,7\text{-dimethyl-1,10-phenanthroline})\text{L}_2]$ and $4.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ for $[\text{Cu}(1,10\text{-phenanthroline})(\text{H}_2\text{O})\text{L}_2]$ [14].

Table 3. IC_{50} values of the compounds against MCF-7 and HepG2 cell lines

Таблица 3. Значения IC_{50} для полученных соединений по отношению к клеточным линиям MCF-7 и HepG2

Compound	IC_{50} value, μM	
	MCF-7 cells	HepG2 cells
$\text{Cu}(\text{OAc})_2$	>50	>50
HL	>50	>50
1,10-phenanthroline-5,6-dione	0.73 ± 0.06	3.3 ± 0.6
$[\text{Cu}(\text{phendione})\text{L}_2] \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	0.96 ± 0.13	0.60 ± 0.03
Cisplatin	33.7 ± 1.8	33.0 ± 5.4

CONCLUSIONS

Mononuclear copper(II) complex based on 4,5-dichloro-isothiazole-3-carboxylic acid and 1,10-phenanthroline-5,6-dione $[\text{Cu}(\text{phendione})\text{L}_2]$ has been obtained and characterized by several physicochemical methods. The results of single crystal X-ray diffraction indicate that complex reveals square pyramidal coordination environment of central atom which consist of two O atoms of the isothiazoles carboxylates, one N of the isothiazole ligand and two N atoms of the phendione. According to DFT-calculations, the value of energy gap between HOMO and LUMO of complex is small (-0.981 eV), thus, $[\text{Cu}(\text{phendione})\text{L}_2]$ refers to soft

molecules. This compound causes pronounced cytotoxic effect against HepG2 and MCF-7 cells in 0.1–25 concentration range which is an order of magnitude higher than cisplatin cytotoxicity. $[\text{Cu}(\text{phendione})\text{L}_2]$ is part of a series of mixed-ligand copper(II) complexes with HL and various oligopyridines. Cytotoxicity of these complexes increases with the transition from 1,10-phenanthroline to 4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline and is maximal in the 1,10-phenanthroline-5,6-dione based complex. Thus, this work helps to understand structure-cytotoxic activity relationships for the oligopyridine based isothiazole copper(II) complexes.

REFERENCES

1. Bencini A., Lippolis V. 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes. *Coordination Chemistry Reviews*. 2010;254(17):2096–2180. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.04.008>.
2. Krasnovskaya O., Naumov A., Guk D., Gorelkin P., Erofeev A., Beloglazkina E., et al. Copper coordination compounds as biologically active agents. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(11):3965. <https://doi.org/10.3390/ijms21113965>.
3. Dey D., Roy A. B., Ranjani A., Gayathri L., Chandraleka S., Dhanasekaran D., et al. Synthesis and bio-catalytic activity of isostructural cobalt(III)-phenanthroline complexes. *Journal of Chemical Sciences*. 2015;127(4):649–661. <https://doi.org/10.1007/s12039-015-0817-y>.

4. Al-Omair M. A. Biochemical activities and electronic spectra of different cobalt phenanthroline complexes. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019;12(7):1061–1069. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.11.006>.
5. Congradyová A., Jomová K., Kuckova L., Kožíšek J., Moncol' J., Valko M. Antimicrobial activity of copper(II) complexes. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2014;3(1):67–70.
6. Mahalakshmi R., Raman N. A Therapeutic journey of mixed ligand complexes containing 1,10-phenanthroline derivatives: A review. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 2016;8(3):1–6.
7. Viganor L., Howe O., McCarron P., McCann M., Devereux M. The antibacterial activity of metal complexes containing 1,10-phenanthroline: Potential as alternative therapeutics in the era of antibiotic resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2016;17(11):1280–1302. <https://doi.org/10.2174/15680266166666161003143333>.
8. Galindo-Murillo R., García-Ramos J. C., Ruiz-Azuara L., Cheatham T. E., Cortés-Guzmán F. Intercalation processes of copper complexes in DNA. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(11):5364–5376. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv467>.
9. Sigman D. S., Graham D. R., D'Aurora V., Stern A. M. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline.cuprous complex. Inhibition of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Journal of Biological Chemistry*. 1979;254(24):12269–12272.
10. Serment-Guerrero J., Bravo-Gomez M. E., Lara-Rivera E., Ruiz-Azuara L. Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeinas: Clues about their mechanisms of action. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2017;166:68–75. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.007>.
11. Bravo-Gómez M. E., Dávila-Manzanilla S., Flood-Garibay J., Muciño-Hernández M. Á., Mendoza Á., García-Ramos J. C., et al. Secondary ligand effects on the cytotoxicity of several Casiopeína's group II compounds. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 2012;56(1):85–92.
12. Tabti R., Tounsi N., Gaiddon C., Bentouhami E., Désaubry L. Progress in copper complexes as anticancer agents. *Medicinal Chemistry*. 2017;7(5):875–879. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000445>.
13. Kletskov A. V., Bumagin N. A., Zubkov F. I., Grudin D. G., Potkin V. I. Isothiazoles in the design and synthesis of biologically active substances and ligands for metal complexes. *Synthesis*. 2020;52(2):159–188. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1690688>.
14. Eremina J. A., Lider E. V., Sukhikh T. S., Klyushova L. S., Perepechaeva M. L., Sheven' D. G., et al. Water-soluble copper(II) complexes with 4,5-dichloro-isothiazole-3-carboxylic acid and heterocyclic N-donor ligands: Synthesis, crystal structures, cytotoxicity, and DNA binding study. *Inorganica Chimica Acta*. 2020;510. Article number 119778. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119778>.
15. Kaberdin R. V., Potkin V. I. Isothiazoles (1,2-thiazoles): synthesis, properties and applications. *Russian Chemical Reviews*. 2002;71(8):673–694.
16. De Oliveira Silva A., McQuade J., Szostak M. Recent Advances in the Synthesis and Reactivity of Isothiazoles. *Advanced Synthesis and Catalysis*. 2019;361(13):3050–3067. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900072>.
17. Perdew J. P., Burke K., Ernzerhof M. Generalized gradient approximation made simple. *Physical Review Letters*. 1996;77(18):3865–3868. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.77.3865>.
18. Van Lenthe E., Baerends E. J. Optimized Slater-type basis sets for the elements 1–118. *Journal of Computational Chemistry*. 2003;24(9):1142–1156. <https://doi.org/10.1002/jcc.10255>.
19. Sheldrick G. M. SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallographica, Section A: Foundations of Crystallography*. 2015;A71(1):3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053273314026370>.
20. Sheldrick G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica, Section C: Structural Chemistry*. 2015;C71(1):3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218.3>.
21. Dolomanov O. V., Bourhis L. J., Gildea R. J., Howard J. A. K., Puschmann H. OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of Applied Crystallography*. 2009;42(2):339–341. <http://dx.doi.org/10.1107/S0021889808042726>.
22. Eremina J. A., Lider E. V., Kuratieva N. V., Samsonenko D. G., Klyushova L. S., Sheven' D. G., et al. Synthesis and crystal structures of cytotoxic mixed-ligand copper(II) complexes with alkyl tetrazole and polypyridine derivatives. *Inorganica Chimica Acta*. 2021;516. Article number 120169. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.120169>.
23. Pearson R. G. Absolute electronegativity and hardness: applications to organic chemistry. *Journal of Organic Chemistry*. 1989;54(6):1423–1430. <https://doi.org/10.1021/jo00267a034>.
24. Eremina J. A., Ermakova E. A., Smirnova K. S., Klyushova L. S., Berezin A. S., Sukhikh T. S., et al. Cu(II), Co(II), Mn(II) complexes with 5-phenyl-tetrazole and polypyridyl ligands: Synthesis, characterization and evaluation of the cytotoxicity and antimicrobial activity. *Polyhedron*. 2021;206. Article number 115352. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2021.115352>.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Bencini A., Lippolis V. 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes // *Coordination Chemistry Reviews*. 2010. Vol. 254, no. 17. P. 2096–2180. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.04.008>.
2. Krasnovskaya O., Naumov A., Guk D., Gorelkin P., Erofeev A., Beloglazkina E., et al. Copper coordination compounds as biologically active agents // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, no. 11. P. 3965. <https://doi.org/10.3390/ijms21113965>.
3. Dey D., Roy A. B., Ranjani A., Gayathri L.,

- Chandraleka S., Dhanasekaran D., et al. Synthesis and bio-catalytic activity of isostructural cobalt(III)-phenanthroline complexes // *Journal of Chemical Sciences*. 2015. Vol. 127, no. 4. P. 649–661. <https://doi.org/10.1007/s12039-015-0817-y>.
4. Al-Omair M. A. Biochemical activities and electronic spectra of different cobalt phenanthroline complexes // *Arabian Journal of Chemistry*. 2019. Vol. 12, no. 7. P. 1061–1069. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.11.006>.
5. Čongrádyová A., Jomová K., Kuckova L., Kožíšek J., Moncol' J., Valko M. Antimicrobial activity of copper(II) complexes // *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2014. Vol. 3, special issue 1. P. 67–70.
6. Mahalakshmi R., Raman N. A Therapeutic journey of mixed ligand complexes containing 1,10-phenanthroline derivatives: A review // *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 2016. Vol. 8, no. 3. P. 1–6.
7. Viganor L., Howe O., McCarron P., McCann M., Devereux M. The antibacterial activity of metal complexes containing 1,10-phenanthroline: Potential as alternative therapeutics in the era of antibiotic resistance // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2016. Vol. 17, no. 11. P. 1280–1302. <https://doi.org/10.2174/1568026616666161003143333>.
8. Galindo-Murillo R., García-Ramos J. C., Ruiz-Azuara L., Cheatham T. E., Cortés-Guzmán F. Inter-calation processes of copper complexes in DNA // *Nucleic Acids Research*. 2015. Vol. 43, no. 11. P. 5364–5376. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv467>.
9. Sigman D. S., Graham D. R., D'Aurora V., Stern A. M. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline.cuprous complex. Inhibition of *Escherichia coli* DNA polymerase I // *Journal of Biological Chemistry*. 1979. Vol. 254, no. 24. P. 12269–12272.
10. Serment-Guerrero J., Bravo-Gomez M. E., Lara-Rivera E., Ruiz-Azuara L. Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeinas: Clues about their mechanisms of action // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2017. Vol. 166. P. 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.007>.
11. Bravo-Gómez M. E., Dávila-Manzanilla S., Flood-Garibay J., Muciño-Hernández M. Á., Mendoza Á., García-Ramos J. C., et al. Secondary ligand effects on the cytotoxicity of several Casiopeína's group II compounds // *Journal of the Mexican Chemical Society*. 2012. Vol. 56, no. 1. P. 85–92.
12. Tabti R., Tounsi N., Gaidon C., Bentouhami E., Désaubry L. Progress in copper complexes as anti-cancer agents // *Medicinal Chemistry*. 2017. Vol. 7, no. 5. P. 875–879. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000445>.
13. Kletskov A. V., Bumagin N. A., Zubkov F. I., Grudinin D. G., Potkin V. I. Isothiazoles in the design and synthesis of biologically active substances and ligands for metal complexes // *Synthesis*. 2020. Vol. 52, no. 2. P. 159–188. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1690688>.
14. Eremina J. A., Lider E. V., Sukhikh T. S., Klyushova L. S., Perepechaeva M. L., Sheven' D. G., et al. Water-soluble copper(II) complexes with 4,5-dichloro-isothiazole-3-carboxylic acid and heterocyclic N-donor ligands: Synthesis, crystal structures, cytotoxicity, and DNA binding study // *Inorganica Chimica Acta*. 2020. Vol. 510. Article number 119778. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119778>.
15. Kabardin R. V., Potkin V. I. Isothiazoles (1,2-thiazoles): synthesis, properties and applications // *Russian Chemical Reviews*. 2002. Vol. 71, no. 8. P. 673–694.
16. De Oliveira Silva A., McQuade J., Szostak M. Recent Advances in the Synthesis and Reactivity of Isothiazoles // *Advanced Synthesis and Catalysis*. 2019. Vol. 361, no. 13. P. 3050–3067. <https://doi.org/10.1002/adsc.201900072>.
17. Perdew J. P., Burke K., Ernzerhof M. Generalized gradient approximation made simple // *Physical Review Letters*. 1996. Vol. 77, no. 18. P. 3865–3868. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.77.3865>.
18. Van Lenthe E., Baerends E. J. Optimized Slater-type basis sets for the elements 1-118 // *Journal of Computational Chemistry*. 2003. Vol. 24, no. 9. P. 1142–1156. <https://doi.org/10.1002/jcc.10255>.
19. Sheldrick G. M. SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination // *Acta Crystallographica, Section A: Foundations of Crystallography*. 2015. Vol. A71, no. 1. P. 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053273314026370>.
20. Sheldrick G. M. Crystal structure refinement with SHELXL // *Acta Crystallographica, Section C: Structural Chemistry*. 2015, vol. C71, no. 1, pp. 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
21. Dolomanov O. V., Bourhis L. J., Gildea R. J., Howard J. A. K., Puschmann H. OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program // *Journal of Applied Crystallography*. 2009. Vol. 42, no. 2. P. 339–341. <http://dx.doi.org/10.1107/S0021889808042726>.
22. Eremina J. A., Lider E. V., Kuratieva N. V., Samsonenko D. G., Klyushova L. S., Sheven' D. G., et al. Synthesis and crystal structures of cytotoxic mixed-ligand copper(II) complexes with alkyl tetrazole and polypyridine derivatives // *Inorganica Chimica Acta*. 2021. Vol. 516. Article number 120169. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.120169>.
23. Pearson R. G. Absolute electronegativity and hardness: applications to organic chemistry // *Journal of Organic Chemistry*. 1989. Vol. 54, no. 6. P. 1423–1430. <https://doi.org/10.1021/jo00267a034>.
24. Eremina J. A., Ermakova E. A., Smirnova K. S., Klyushova L. S., Berezin A. S., Sukhikh T. S., et al. Cu(II), Co(II), Mn(II) complexes with 5-phenyl-tetrazole and polypyridyl ligands: Synthesis, characterization and evaluation of the cytotoxicity and antimicrobial activity // *Polyhedron*. 2021. Vol. 206. Article number 115352. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2021.115352>.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Yuliya A. Golubeva,
Postgraduate Student,
Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry
SB RAS,
3, Acad. Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
julia1995@ngs.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5404-5357>

Ю. А. Голубева,
аспирант,
Институт неорганической химии
им. А. В. Николаева СО РАН,
630090, Новосибирск, пр-т Академика
Лаврентьева, 3,
Российская Федерация,
julia1995@ngs.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5404-5357>

Ksenia S. Smirnova,
Postgraduate Student,
Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry
SB RAS,
3, Acad. Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
smirnova_ksenya96@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6345-3467>

К. С. Смирнова,
аспирант,
Институт неорганической химии
им. А.В. Николаева СО РАН,
630090, Новосибирск,
пр-т Академика Лаврентьева, 3,
Российская Федерация,
smirnova_ksenya96@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6345-3467>

Lubov' S. Klyushova,
Junior Researcher,
Institute of Molecular Biology and Biophysics,
Federal Research Center for Fundamental
and Translational Medicine,
2/12, Timakov St., Novosibirsk, 630060,
Russian Federation,
klyushovals@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4820-2536>

Л. С. Ключова,
младший научный сотрудник,
Научно-исследовательский институт
молекулярной биологии и биофизики –
структурное подразделение
Федерального исследовательского центра
фундаментальной и трансляционной
медицины,
630060, Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12,
Российская Федерация,
klyushovals@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4820-2536>

Vladimir I. Potkin,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Institute of Physical Organic Chemistry
of the National Academy of Sciences
of Belarus,
13, Surganov St., Minsk, 220072,
Belarus,
potkin@ifoch.bas-net.by
<https://orcid.org/0000-0001-7823-3208>

В. И. Поткин,
д.х.н., профессор,
Институт физико-органической химии
НАН Беларуси,
220072, Минск, ул. Сурганова, 13,
Беларусь,
potkin@ifoch.bas-net.by
<https://orcid.org/0000-0001-7823-3208>

Elizaveta V. Lider,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Scientist,
Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry
SB RAS,
3, Acad. Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
lidalider@ngs.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4363-6829>

Е. В. Лидер,
к.х.н., старший научный сотрудник,
Институт неорганической химии
им. А. В. Николаева СО РАН,
630090, Новосибирск,
пр-т Академика Лаврентьева, 3,
Российская Федерация,
lidalider@ngs.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4363-6829>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

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.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Information about the article

*The article was submitted 19.10.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.*

Информация о статье*

*Поступила в редакцию 19.10.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.*

Научная статья

УДК 578.4: 577.2: 574.5

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-540-548>



Разработка и испытание методик определения наличия в пробах воды ДНК вирусов папилломы человека 6-го и 16-го типов

Алексей Сергеевич Столбиков***, Рюрик Константинович Салаяев*,
Наталья Игоревна Рекославская*

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
г. Иркутск, Российская Федерация

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

Автор, ответственный за переписку: Алексей Сергеевич Столбиков, valkir5@yandex.ru

Аннотация. В данном исследовании авторами решались задачи разработки и испытания методик определения в пробах воды ДНК опасных вирусов папилломы человека 6-го и 16-го типов. Биоинформационными методами с помощью базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) и программы BioEdit были изучены консервативные участки нуклеотидных последовательностей HPV6 L1 и HPV16 L1. Всего было исследовано 135 нуклеотидных последовательностей HPV6 L1 и 945 нуклеотидных последовательностей HPV16 L1. На выявленные консервативные участки нуклеотидных секвенсов, с помощью специализированных программ (PerlPrimer v.1.1.21, FastPCR 6.6, Primer3Plus), было разработано 5 пар специфических праймеров. Опробовано несколько методик взятия проб из различных водных объектов, находящихся в районе пос. Листвянка (оз. Байкал). Образцы подвергались комплексной очистке от нерастворимых частиц и бактериального загрязнения, затем исследовались на наличие ДНК ВПЧ с помощью ПЦР-анализа с использованием праймеров, комплементарных генетическим последовательностям ВПЧ6 L1 и ВПЧ16 L1. В результате проведенных исследований в водных пробах были обнаружены ДНК ВПЧ 6-го и 16-го типов. Разработанные и опробованные методики взятия и исследования проб из различных водных источников Байкальской природной территории с последующим проведением ПЦР-анализа позволили получить положительные результаты присутствия опасных вирусов. Полагаем, что предложенные методики тестирования водных проб на наличие в них ВПЧ будут полезны при разработке эффективного мониторинга водных объектов и сточных вод не только Байкальского, но и других регионов.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, ВПЧ6, ВПЧ16, ПЦР-анализ, биоинформационные методы

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Иркутской области в рамках научного проекта № 20-44-380001.

Для цитирования: Столбиков А. С., Салаяев Р. К., Рекославская Н. И. Разработка и испытание методик определения наличия в пробах воды ДНК вирусов папилломы человека 6-го и 16-го типов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 540–548. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-540-548>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Development and testing of procedures for detecting HPV 6 and HPV 16 DNA in water samples

Aleksey S. Stolbikov***, Ryurik K. Salyaev*,
Nataliya I. Rekoslavskaya*

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS,
Irkutsk, Russian Federation

© Столбиков А. С., Салаяев Р. К., Рекославская Н. И., 2021

***Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation*

Corresponding author: Aleksey S. Stolbikov, valkir5@yandex.ru

Abstract. The present study aims to develop and test procedures for detecting the DNA of dangerous human papillomaviruses (HPV) types 6 and 16 in water samples. The conserved segments of HPV 6 L1 and HPV 16 L1 nucleic acid sequences were studied using bioinformatic methods with the help of the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database and the BioEdit program. A total of 135 nucleic acid sequences of HPV6 L1 and 945 nucleic acid sequences of HPV16 L1 were examined. Five pairs of specific primers were developed for the identified conserved segments of nucleic acid sequences using specialized programs (PerlPrimer v.1.1.21, FastPCR 6.6, and Primer3Plus). In addition, several procedures for collecting samples from various water bodies located near Listvyanka settlement (Lake Baikal) were tested. The samples were subjected to comprehensive purification from insoluble particles and bacterial contamination to be tested for the presence of HPV DNA via PCR analysis using primers complementary to the nucleic acid sequences of HPV6 L1 and HPV16 L1. The conducted studies revealed HPV 6 and HPV 16 DNA in the water samples. Due to the use of the developed and tested procedures for collecting and examining samples from various water sources in the Baikal Natural Territory followed by a PCR analysis, it was possible to detect the presence of dangerous viruses. The proposed procedure of testing water samples for the presence of HPV can be useful in developing effective monitoring of water bodies and wastewater both in Baikal and other regions.

Keywords: human papillomavirus, HPV6, HPV16, PCR analysis, bioinformatic methods

Funding: The reported study was funded by RFBR and the Government of the Irkutsk Region, project no. 20-44-380001.

For citation: Stolbikov A. S., Salyaev R. K., Rekoslavskaya N. I. Development and testing of procedures for detecting HPV 6 and HPV 16 DNA in water samples. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2021;11(4):540-548. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-540-548>.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) – это большая группа патогенных генетически разнообразных ДНК-содержащих вирусов, которая получила довольно широкое распространение в человеческой популяции. Сам по себе ВПЧ не является смертельно опасным заболеванием, риск летального исхода возникает при трансформации новообразований в злокачественные опухоли. Поэтому среди папилломавирусов выделяют виды с низким и высоким онкогенным риском.

Наиболее известной формой рака, вызванной ВПЧ, является рак шейки матки, за 70% случаев рака шейки матки ответственны вирусы 16-го и 18-го типов. В ряде стран распространенность ВПЧ-инфекции у женщин оценивается в 40–80%, а вероятность персистенции ВПЧ-инфекции – в 80–90% [1, 2]. По данным Всемирной организации здравоохранения, этот вид рака занимает четвертое место в мире по распространенности и является причиной 7,5% всех случаев смерти от онкологических заболеваний. Например, только в 2018 г. в мире от этого заболевания скончалось 311000 женщин¹. По многолетним наблюдениям российских ученых, смертность от рака шейки матки в нашей стране составила в среднем 6000 женщин ежегодно (в пе-

риод 2005–2015 гг.) [4]. ВПЧ 6-го типа приводит к образованию остроконечных кондилом и может провоцировать развитие респираторного папилломатоза, при котором опухоли образуются в дыхательных путях, идущих от носа и полости рта в легкие.

Основной метод защиты от ВПЧ – своевременная вакцинация. В некоторых странах она проводится девочкам начиная с 9–11 лет, а в США и Канаде прививка делается и мальчикам для снижения числа носителей вируса. Понимая угрозу распространения ВПЧ, в США, например, ежегодные расходы на цели профилактики и борьбы с ВПЧ-ассоциированными болезнями составляют около 3 млрд долл. [5, 6]. В России вакцинация не является обязательной и не входит в национальный календарь профилактических прививок, однако она рекомендована Союзом педиатров России, и многие регионы выделяют средства на бесплатную вакцинацию девочек².

Считается, что папилломавирусы имеют достаточно высокую устойчивость к воздействию внешних факторов: хорошо переносят высокие температуры, воздействие ультрафиолетовых лучей, эфира, хлороформа и других химических веществ [7, 8]. Подтверждением этому служит ряд исследований ученых разных стран, в ходе

¹Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer // World Health Organization (WHO). 24 January 2019. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer) [Accessed 12th October 2020].

²Кодзаева Н. Лечение ВПЧ [Электронный ресурс] // Медпортал. URL: <https://medportal.ru/enc/infection/std/lechenie-vpch/> (15.04.2021).

которых присутствие ВПЧ обнаружено в водоемах и сточных водах [9–17]. Принято считать, что основным путем передачи инфекций ВПЧ является генитальный контакт. Однако есть подтвержденные случаи инфицирования ВПЧ лиц, не вступавших в половые отношения [7, 8, 18]. Поскольку папилломавирусы могут передаваться не только половым путем, присутствие ВПЧ в водоемах создает потенциальную угрозу передачи инфекции через контакт с водой.

Исследования различных водоемов, находящихся вблизи населенных пунктов, а также сточных вод на наличие в них ВПЧ стали проводиться относительно недавно. Нам не удалось обнаружить информацию о проведении подобных исследований в Байкальском регионе, хотя, согласно медицинской статистике, уровень ВПЧ-ассоциированных заболеваний как в России в целом, так и в Иркутской области остается крайне высоким [4, 19].

Нашей целью являлась разработка и испытание методик взятия проб воды и их комплексной очистки от нерастворимых частиц и бактериального загрязнения с последующим проведением ПЦР-анализа для выявления ДНК вирусов папилломы человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Разработка дизайна специфических праймеров, необходимых для проведения ПЦР-анализа:

– *множественное нуклеотидное выравнивание различных изолятов HPV6 L1, HPV16 L1.* Поиск нуклеотидных последовательностей различных изолятов ВПЧ6 и ВПЧ16 осуществляли с помощью крупнейшей базы данных генетических последовательностей NCBI (GenBank). Информация в NCBI находится в свободном доступе. Для получения необходимых нуклеотидных сиквенсов использовался персональный компьютер с доступом в сеть «Интернет». Последовательности HPV6 L1 и HPV16 L1, кодирующие основной поверхностный белок L1 папилломавирусов человека, сохранялись в виде массивов данных в формате txt. Определение консервативных участков в нуклеотидных последовательностях HPV6 L1 и HPV16 L1 осуществляли с помощью редактора множественного выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей BioEdit (версия 7.2.5.) и программы Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Для множественного нуклеотидного выравнивания HPV6 L1 использовали 139 сиквенсов. Выравнивание проводили относительно “HG793924.1” Human papillomavirus type 6 complete genome, isolate 116 (NCBI). Множественное нуклеотидное выравнивание проводили с использованием 945 сиквенсов HPV16 L1. Выравнивание осуществляли относительно “U37217.1” Human papillomavirus type 16 variant L1 and L2 capsid protein

genes, complete cds (NCBI);

– *подбор специфических праймеров к HPV6 L1 и HPV16 L1 с помощью бионформационных программ.* Дизайн специфических праймеров, необходимых для проведения ПЦР-анализа, разрабатывали с помощью специализированных программ PerlPrimer (версия 1.1.21), FastPCR (версия 6.6) и Primer3Plus. Для этого нуклеотидные сиквенсы HPV6 L1 и HPV16 L1 загружали в указанные выше программы, которые позволяли вычислять оптимальные пары специфических праймеров. Из предложенных вариантов праймеров отбирались те пары, которые были комплементарны выявленным консервативным участкам последовательностей ДНК папилломавирусов.

2. Методики взятия и обработки образцов из различных водных источников:

а) методика взятия проб воды и последующая их очистка от нерастворимых частиц и бактериального загрязнения:

– в стерильные пластиковые емкости объемом 500 мл (Corning) помещали образцы бытовых стоков; взятие образцов производили из разных водных объектов или из одного, но с интервалом 5 мин; всего использовали 6 пластиковых емкостей на одну точку пробоотбора;

– после взятия образцов пластиковые емкости закупоривались, их поверхность обрабатывалась дезинфицирующим раствором 96%-го этилового спирта и 3%-й перекиси водорода);

– после маркировки пластиковые емкости с пробами воды упаковывались в теплоизоляционный контейнер, не пропускающий солнечный свет;

– очистка образцов от крупных частиц осуществлялась с помощью центрифугирования в следующих условиях: 4000 g, 15 мин при 4 °C (KR 22i Jouan, Франция, центрифужные пробирки на 50 мл);

– очистка образцов от мелких частиц и бактерий производилась путем центрифугирования в следующих условиях: 10000 g, 15 мин при 4 °C (KR 22i Jouan, Франция, центрифужные пробирки также на 50 мл);

– окончательная очистка образцов бытовых стоков от бактерий осуществлялась с помощью фильтрации через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Whatman, GE Healthcare);

– выделение вирусной ДНК из очищенных образцов осуществляли с помощью ультрацентрифужных модулей Amicon Ultra-15 (Millipore, Ирландия), для этого использовалась центрифуга CM-6M.01 (ELMI, Латвия) с адаптером для пробирок типа Фалькон на 50 мл.

Дополнительным этапом было концентрирование и очистка вирусной ДНК с помощью реактива TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc., США). Образцы вирусной ДНК переносились в пробирки объемом 50 мл типа Фалькон (SARSTEDT, Германия), которые при необходимости помеща-

лись в низкотемпературный холодильник на -80 °С.

б) методика взятия образцов из различных водных источников, включая сточные воды, с помощью набора “для концентрирования вирусов из расфасованных вод и экстрактов пищевых продуктов” (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь):

- водные образцы помещались в стерильные пластиковые емкости;

- во вскрытые в стерильных условиях емкости вносили по 0,25 г адсорбента из набора; емкости закрывали и помещали на шуттель-аппарат или шейкер для встряхивания;

- пробирку с адсорбентом центрифугировали при 2000 об./мин, после чего удаляли супернатант, а осадок промывали в 3 мл стерильной бидистиллированной воды, затем центрифугировали при 2000 об./мин;

- адсорбент заливали 3-мя мл элюента из набора и встряхивали на шуттель-аппарате или шейкере, затем центрифугировали при 2000 об./мин; отбирали супернатант в пробирку, куда помещали ПЭГ-6000 из набора; смесь перемешивали и инкубировали при 4 °С в течение 12 ч;

- после инкубации суспензию центрифугировали при 4000 об./мин в течение 1,5 ч; супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 200 мкл стерильной бидистиллированной воды и замораживали при -20 °С.

Дополнительным этапом было концентрирование и очистка вирусной ДНК с помощью реактива TRI REAGENT.

в) методика взятия образцов из различных водных источников, включая сточные воды, с помощью набора “для концентрирования вирусов из питьевой воды в системе децентрализованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, поверхностных и сточных вод” (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь):

- пакет с адсорбентом из набора помещали в водоисточник на глубину 10–15 см от поверхности на 24 ч;

- для элюирования вирусных частиц пакет с адсорбентом помещали в чашку Петри и вскрывали его; к адсорбенту приливали 3 мл элюента, затем полученную взвесь инкубировали при комнатной температуре;

- взвесь адсорбента помещали в пробирку и центрифугировали при 2000 об./мин; супернатант помещали в пробирку и добавляли 2 объема хлороформа; полученную смесь встряхивали, а затем центрифугировали при 2000 об./мин; супернатант помещали в стерильную пробирку и хранили при -20 °С.

Дополнительным этапом было концентрирование и очистка вирусной ДНК с помощью TRI REAGENT.

г) методика взятия образцов из различных водных источников, включая сточные воды, с помощью набора “для концентрирования виру-

сов из, поверхностных вод, водоисточников и колодцев” (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь):

- волокнистый фильтр помещали в водоисточник на глубину 10–15 см; время экспозиции фильтра зависело от скорости течения воды и могло варьировать от 2 до 10 ч;

- для элюирования вирусных частиц в емкость с фильтром приливали 45 мл элюента и инкубировали;

- к полученному элюату добавляли ПЭГ-6000 из набора. Смесь перемешивали и помещали на 10–12 ч для инкубации при температуре 4-6 °С;

- г)** полученную суспензию центрифугировали при 3000 об./мин. Супернатант удаляли, а для исследования оставляли нижнюю фазу объемом 5 мл;

- д)** удаление бактериальной флоры осуществляли с помощью хлороформа.

Дополнительным этапом было концентрирование и очистка вирусной ДНК с помощью TRI REAGENT.

3. ПЦР-анализ проб воды. Для определения в образцах водных проб наличия ДНК высокопатогенных типов папилломавирусов использовали 8 пар праймеров. Так как мы не обладали информацией о том, какие изоляты ВПЧ распространены в нашем регионе, было принято решение использовать праймеры GP5+/6+, созданные к высококонсервативным участкам HPV6 L1 и HPV16 L1 [20, 21]. Использовались также 5 пар праймеров собственного дизайна.

Полимеразную цепную реакцию осуществляли в ДНК-амплификаторах GENE CYCLER (Bio-Rad, Япония) и Mastercycler personal (Eppendorf, Германия). Для ПЦР использовали 3 вида наборов: ReadyMix (Sigma-Aldrich, США), K001 и K002 (SibEnzyme, Россия).

Этапы ПЦР-анализа с использованием набора ReadyMix проводили в следующих температурных режимах:

- иницирующая денатурация – 94 °С, 5 мин;
- 35 циклов амплификации: денатурация – 95 °С, 45 с (отжиг для каждой пары праймеров подбирался индивидуально, 45 с), и элонгация – 72 °С, 2 мин;
- заключительная элонгация – 72 °С, 5 мин.

ПЦР с использованием наборов K001 и K002 проводили в следующем температурном режиме:

- иницирующая денатурация (94 °С, 3 мин., 80 °С, 30 сек);
- 30 циклов амплификации: денатурация (95 °С, 15 сек), отжиг для каждой пары праймеров подбирался индивидуально (30 сек) и элонгация (72 °С, 2 мин);

Качество ПЦР-продукта определяли с помощью аппарата для проведения электрофоретического разделения нуклеиновых кислот Mini gel unit, (Amersham Biosciences, США) в 1,2–1,7%-м

агарозном геле (GE Healthcare, Швеция; Диаэм, Россия; Biotechnology, США) с окрашиванием бромистым этидием и визуализацией на геледокументирующей системе GelDoc XR+ (Bio-Rad, США).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате нуклеотидного выравнивания были определены консервативные участки сиквенса HPV6 L1 и HPV16 L1. При выявлении консервативных участков у HPV16 L1 возникли некоторые сложности, связанные с большим количеством выравниваемых последовательностей, при которых наблюдалось значительное различие между сиквенсами. В итоге удалось обнаружить малое количество участков, которые у всех 945 нуклеотидных последовательностей были идентичны. Успешная разработка эффективных праймеров в таких условиях показалась маловероятной, поэтому было решено в качестве консервативных участков остановиться на тех, в которых при множественном выравнивании обнаружены минимальные различия (1 нуклеотид) у единичных изолятов.

Используя выявленные консервативные участки сиквенса HPV6 L1 и HPV16 L1, с помощью биоинформационных программ было разработано 5 пар праймеров.

Для последовательности HPV6 L1:

1-ая пара:

Forward: 5'-TGTTGTGCCAAAGGTGTCAG-3'

(20 п.н.) Tm= 61,52 °C;

Revers: 5'-GTGTCAACCATATCGCCATCC-3'

(21 п.н.) Tm= 61,64 °C;

2-ая пара:

Forward: 5'-ATGGCTGCAGACCCATATGG-3'

(20 п.н.) Tm= 59,9 °C;

Revers: 5'-AGGTAATGGCCTGTGACTGC-3'

(20 п.н.) Tm= 60 °C.

Для последовательности HPV16 L1:

1-ая пара:

Forward: 5'-CTGTGTAGGTGTTGAGGTAGG-3'

(21 п.н.) Tm=59,94 °C;

Revers: 5'-TGTAGAGGTAGATGAGGTGG-3'

(20 п.н.) Tm=57,73 °C;

2-ая пара:

Forward: 5'-CTGTGTAGGTGTTGAGGTAGG-3'

(21 п.н.) Tm=59,94 °C;

Revers: 5'-AGCCTGTAATGTAGTAAAGTCC-3'

(22 п.н.) Tm=57,74 °C;

3-я пара:

Forward: 5'-CTACTTGCAGTTGGACATCCC-3'

(21 п.н.) Tm= 56,19 °C;

Revers: 5'-CAGCCGCTGTGTATCTGGATT-3'

(21 п.н.) Tm= 56,7 °C.

Для испытания представленных выше методик были взяты водные образцы из оз. Байкал в районе п. Листвянка. Отмечено, что все методики взятия образцов оказались достаточно эффективными и позволили получить искомые результаты. При этом методики **а** и **б** являются наиболее универсальными и позволяют брать пробы из любых водоисточников и с любой глубины, а методика **б** является также более простой в реализации и позволяет получать не только вирусную ДНК, но и вирусные частицы. Методика **в** дает возможность брать пробы с небольшой глубины и позволяет обнаружить даже небольшое количество вирусного материала в большом объеме воды. Методику **г** целесообразно применять для водоисточников с умеренным и сильным потоком воды.

В результате ПЦР-анализа водных проб, взятых в районе пляжа п. Листвянка у береговой черты, были обнаружены ДНК папилломавирусов 6-го и 16-го типов (рис. 1, 2).

Амплификат на 571 пару
нуклеотидов.

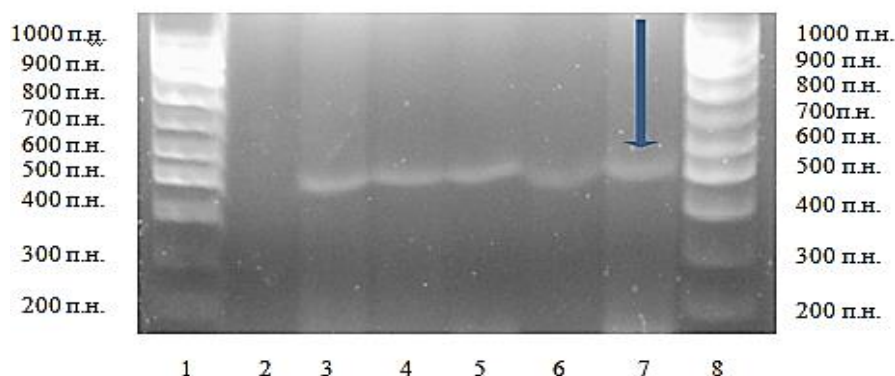


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с использованием образцов, взятых в районе пляжа в п. Листвянка (оз. Байкал). Пара праймеров к HPV6 L1 (571 п.н.). Примечание: 1, 8 – ДНК маркер на 100 bp (СибЭнзим); 2 – контрольный образец (дистиллированная вода); 3-7 – исследуемые образцы

Fig. 1. Electrophoretic separation of amplification products obtained using samples taken in the beach area in Listvyanka (Lake Baikal). A pair of primers for HPV6 L1 (571 bp): 1, 8 – DNA marker per 100 bp (SibEnzyme); 2 – control sample (distilled water); 3-7 – tested samples

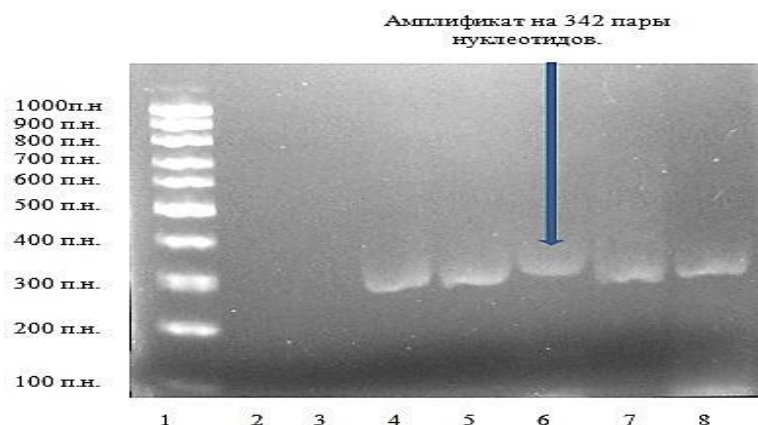


Рис. 2. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации, полученных с использованием образцов, взятых в районе пляжа п. Листвянка (оз. Байкал). Пара праймеров к HPV16 L1 (342 п.н.):
1 – ДНК маркер на 100 bp (Bioron, Германия); 2 – контрольный образец (дистиллированная вода);
3 – контрольный образец (водопроводная вода); 4–8 – исследуемые образцы

Fig. 2. Electrophoretic separation of amplification products obtained using samples taken in the beach area of Listvyanka (Lake Baikal). A pair of primers for HPV16 L1 (342 bp):
1 – DNA marker at 100 bp (Bioron, Germany); 2 – control sample (distilled water);
3 – control sample (tap water); 4–8 – tested samples

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опробованные нами методики взятия и исследования проб из различных водных источников в районе п. Листвянка с последующим проведением ПЦР-анализа позволили получить искомые положительные результаты. Анализ прибрежных вод, проведенный с помощью указанных выше методик, показал присутствие ДНК

патогенных вирусов папилломы человека 6-го и 16-го типов.

Полагаем, что предложенные методики тестирования водных проб на наличие в них ВПЧ будут полезны при разработке эффективного мониторинга водных объектов и сточных вод не только Байкальского, но и других регионов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Костин А. А., Старинский В. В., Самсонов Ю. В., Асратов А. Т. Анализ статистических данных о злокачественных новообразованиях, ассоциированных с вирусом папилломы человека // Исследования и практика в медицине. 2016. Т. 3. N 1. С. 66–78. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2016-3-1-9>.
2. Bosch F. X., Broker T. R., Forman D., Moscicki A.-B., Gillison M. L., Doorbar J., et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases // Vaccine. 2013. Vol. 31, suppl. 7. P. H1–H31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.003>.
3. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D. M., Piñeros M., et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods // International Journal of Cancer. 2019. Vol. 144, no. 8. P. 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.
4. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, В. Г. Петровой. М.: Изд-во МНИОИ им. П. А. Герцена, 2017. 250 с.
5. McLaughlin-Drubin M. E., Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses // Virus Research. 2009. Vol. 143, no. 2. P. 195–208. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.06.008>.
6. Chesson H. W., Blandford J. M., Gift T. L., Tao G., Irwin K. L. The estimated direct medical cost of sexually transmitted diseases among American youth, 2000 // Perspectives on Sexual and Reproductive Health. 2004. Vol. 36, no. 1. P. 11–19. <https://doi.org/10.1363/psrh.36.11.04>.
7. Ryndock E. J., Meyers C. A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? // Expert Review of Anti-infective Therapy. 2014. Vol. 12, no. 10. P. 1165–1170. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.959497>.
8. Meyers J., Ryndock E., Conway M. J., Meyers C., Robison R. Susceptibility of high-risk human papillomavirus type 16 to clinical disinfectants // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2014. Vol. 69, no. 6. P. 1546–1550. <https://doi.org/10.1093/jac/dku006>.
9. Di Bonito P., Libera S. D., Petricca S., Iaconelli M., Sanguinetti M., Graffeo R., et al. A large spectrum of alpha and beta papillomaviruses are detected in human stool samples // Journal of General Virology. 2015. Vol. 96, no. 3. P. 607–613. <https://doi.org/10.1099/vir.0.071787-0>.
10. Fratini M., Di Bonito P., La Rosa G. Oncogenic Papillomavirus and Polyomavirus in Water Environments: Is There a Potential for Waterborne Transmission? // Food and Environmental Virology. 2014. Vol. 6, no. 1. P. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9134-0>.

11. Symonds E. M., Griffin D. W., Breitbart M. Eukaryotic Viruses in Wastewater Samples from the United States // *Applied and Environmental Microbiology*. 2009. Vol. 75, no. 5. P. 1402–1409. <https://doi.org/10.1128/AEM.01899-08>.
 12. Hamza H., Hamza I. A. Oncogenic papillomavirus and polyomavirus in urban sewage in Egypt // *Science of The Total Environment*. 2018. Vol. 610–611. P. 1413–1420. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.218>.
 13. Cantalupo P. G., Calgua B., Zhao G., Hunders A., Wier A. D., Katz J. P., et al. Raw sewage harbors diverse viral populations // *mBio*. 2011. Vol. 2, no. 5. e00180-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00180-11>.
 14. Di Bonito P., Iaconelli M., Gheit T., Tommasino M., Della Libera S., Bonadonna L., et al. Detection of oncogenic viruses in water environments by a Luminex-based multiplex platform for high throughput screening of infectious agents // *Water Research*. 2017. Vol. 123. P. 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.088>.
 15. La Rosa G., Della Libera S., Petricca S., Iaconelli M., Briancesco R., Paradiso R., et al. First detection of papillomaviruses and polyomaviruses in swimming pool waters: unrecognized recreational water-related pathogens? // *Journal of Applied Microbiology*. 2015. Vol. 119, no. 6. P. 1683–1691. <https://doi.org/10.1111/jam.12925>.
 16. Bonadonna L., La Rosa G. A review and update on waterborne viral diseases associated with swimming pools // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019. Vol. 16, no. 2. Article number 166. <https://doi.org/10.3390/ijerph16020166>.
 17. Iaconelli M., Petricca S., D Libera S., Di Bonito P., La Rosa G. First detection of human papillomaviruses and human polyomaviruses in river Waters in Italy // *Food and Environmental Virology*. 2015. Vol. 7, no. 4. P. 309–315. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9203-7>.
 18. La Rosa G., Fratini M., Accardi L., D'Oro G., Della Libera S., Muscillo M., et al. Mucosal and cutaneous human papillomaviruses detected in raw sewages // *PLOS ONE*. 2013. Vol. 8, no. 1. P. e52391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052391>.
 19. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, В. Г. Петровой. М.: Изд-во МНИОИ им. П. А. Герцена, 2016. 250 с.
 20. De Roda Husman A. M., Walboomers J. M., van den Brule A. J., Meijer C. J., Snijders P. J. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3 ends with adjacent highly conserved sequences improves HPV detection // *Journal of General Virology*. 1995. Vol. 76, no. 4. P. 1057–1062. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-1057>.
 21. Qu W., Jiang G., Cruz Y., Chang C. J., Ho G. Y., Klein R. S., et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems // *Journal of Clinical Microbiology*. 1997. Vol. 35, no. 6. P. 1304–1310. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.6.1304-1310.1997>.
- ### REFERENCES
1. Kostin A. A., Starinskiy V. V., Samsonov Y. V., Asratov A. T. The analysis of statistical data on malignant neoplasms associated with human papillomavirus. *Issledovaniya i Praktika v Meditsine = Research'n Practical Medicine Journal*. 2016;3(1):66–78. (In Russian). <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2016-3-1-9>.
 2. Bosch F. X., Broker T. R., Forman D., Moscicki A.-B., Gillison M. L., Doorbar J., et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases // *Vaccine*. 2013. Vol. 31, suppl. 7. P. H1–H31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.003>.
 3. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D. M., Piñeros M., et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*. 2019;144(8):1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.
 4. Kaprin A. D., Starinskii V. V., Petrova G. V. (eds.) *Malignant neoplasms in Russia in 2015 (morbidity and mortality)*. Moscow: MNIОI im. P. A. Gertsena; 2017. 250 p. (In Russian).
 5. McLaughlin-Drubin M. E., Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Research*. 2009;143(2):195–208. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.06.008>.
 6. Chesson H. W., Blandford J. M., Gift T. L., Tao G., Irwin K. L. The estimated direct medical cost of sexually transmitted diseases among American youth, 2000. *Perspectives on Sexual and Reproductive Health*. 2004;36(1):11–19. <https://doi.org/10.1363/3psrh.36.11.04>.
 7. Ryndock E. J., Meyers C. A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2014;12(10): 1165–1170. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.959497>.
 8. Meyers J., Ryndock E., Conway M. J., Meyers C., Robison R. Susceptibility of high-risk human papillomavirus type 16 to clinical disinfectants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(6):1546–1550. <https://doi.org/10.1093/jac/dku006>.
 9. Di Bonito P., Libera S. D., Petricca S., Iaconelli M., Sanguinetti M., Graffeo R., et al. A large spectrum of alpha and beta papillomaviruses are detected in human stool samples. *Journal of General Virology*. 2015;96(3):607–613. <https://doi.org/10.1099/vir.0.071787-0>.
 10. Fratini M., Di Bonito P., La Rosa G. Oncogenic Papillomavirus and Polyomavirus in Water Environments: Is There a Potential for Waterborne

Transmission? *Food and Environmental Virology*. 2014;6(1):1–12. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9134-0>.

11. Symonds E. M., Griffin D. W., Breitbart M. Eukaryotic Viruses in Wastewater Samples from the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(5):1402–1409. <https://doi.org/10.1128/AEM.01899-08>.

12. Hamza H, Hamza I. A. Oncogenic papillomavirus and polyomavirus in urban sewage in Egypt. *Science of The Total Environment*. 2018;610–611:1413–1420. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.218>.

13. Cantalupo P. G., Calgua B., Zhao G., Hunders A., Wier A. D., Katz J. P., et al. Raw sewage harbors diverse viral populations. *mBio*. 2011;2(5):e00180-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00180-11>.

14. Di Bonito P., Iaconelli M., Gheit T., Tomasino M., Della Libera S., Bonadonna L., et al. Detection of oncogenic viruses in water environments by a Luminex-based multiplex platform for high throughput screening of infectious agents. *Water Research*. 2017;123:549–555. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.088>.

15. La Rosa G., Della Libera S., Petricca S., Iaconelli M., Briancesco R., Paradiso R., et al. First detection of papillomaviruses and polyomaviruses in swimming pool waters: unrecognized recreational water-related pathogens? *Journal of Applied Microbiology*. 2015;119(6):1683–1691. <https://doi.org/10.1111/jam.12925>.

16. Bonadonna L., La Rosa G. A review and update on waterborne viral diseases associated with

swimming pools. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019;16(2). Article number 166. <https://doi.org/10.3390/ijerph16020166>.

17. Iaconelli M., Petricca S., D Libera S., Di Bonito P., La Rosa G. First detection of human papillomaviruses and human polyomaviruses in river Waters in Italy. *Food and Environmental Virology*. 2015;7(4):309–315. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9203-7>.

18. La Rosa G., Fratini M., Accardi L., D'Oro G., Della Libera S., Muscillo M., et al. Mucosal and cutaneous human papillomaviruses detected in raw sewages. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e52391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052391>.

19. Kaprin A. D., Starinskii V. V., Petrova G. V. (eds.) *Malignant neoplasms in Russia in 2014 (morbidity and mortality)*. Moscow: MNIIOI im. P. A. Gertsena; 2016. 250 p. (In Russian).

20. De Roda Husman A. M., Walboomers J. M., van den Brule A. J., Meijer C. J., Snijders P. J. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3 ends with adjacent highly conserved sequences improves HPV detection. *Journal of General Virology*. 1995;76(4):1057–1062. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-1057>.

21. Qu W., Jiang G., Cruz Y., Chang C. J., Ho G. Y., Klein R. S., et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997;35(6):1304–1310. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.6.1304-1310.1997>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

А. С. Столбиков,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация;
доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
valkir5@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6392-9365>

Р. К. Салыев,

д.б.н., член-корреспондент РАН,
советник РАН,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
salyaev@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7602-7301>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Aleksey S. Stolbikov,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation;
Associate Professor,
Irkutsk State University,
1, K. Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
valkir5@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6392-9365>

Ryurik K. Salyaev,

Dr. Sci. (Biology), Corresponding Member
of RAS, Advisor of RAS,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
salyaev@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7602-7301>

Н. И. Рекославская,

д.б.н., главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
rekoslavskaya@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3480-9855>

Nataliya I. Rekoslavskaya,

Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
rekoslavskaya@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3480-9855>

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.*

Информация о статье

*Поступила в редакцию 20.10.2020.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.*

Information about the article

*The article was submitted 20.10.2020.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.*

Научная статья

УДК 581.143.6:582.734.4

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-549-560>



Влияние антиоксидантов и регуляторов роста на органогенез побегов в культуре апикальных меристем *Fragaria × ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier

Елена Валерьевна Амброс*, Екатерина Игоревна Чертенкова**,
Светлана Юрьевна Толузакова***, Елена Геннадиевна Трофимова****,
Татьяна Ивановна Новикова*

*Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск, Российская Федерация

**Национальный исследовательский Томский государственный университет,
г. Томск, Российская Федерация

***Томский сельскохозяйственный институт – филиал Новосибирского государственного
аграрного университета, г. Томск, Российская Федерация

****Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН,
г. Новосибирск, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Амброс Елена Валерьевна, ambros_ev@mail.ru

Аннотация. Одна из проблем при введении в культуру *in vitro* земляники связана с ингибированием процессов органогенеза продуктами фенольного окисления. Кроме того, важную роль играет подбор регуляторов роста, увеличивающих меристематическую активность клеток и пролиферацию побегов на стадии индукции органогенеза. Целью данного исследования являлось получение жизнеспособной культуры апикальных меристем земляники садовой и изучение влияния различных типов антиоксидантов (восстановленного глутатиона, (ВГ) и нового препарата – механокомпозита (МК) на основе биогенного кремния и катехинов зеленого чая, регуляторов роста растений (6-бензиламинопурина, (БАП) и тидиазулона (ТДЗ)) на инициацию образования пазушных побегов в культуре меристем земляники садовой. В качестве первичных эксплантов для введения земляники садовой в культуру *in vitro* использовали верхушечные почки, содержащие апикальную меристему и два листовых примordia, изолированные из столонов двух сортов земляники садовой – Солнечная полянка и Фестивальная ромашка. Впервые обнаружено, что МК обладает более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с ВГ, снижает потемнение исходных эксплантов и увеличивает регенерацию до 13,0% при $p \leq 0,05$. Более того, комбинация МК с регуляторами роста в питательной среде продемонстрировала наилучшее влияние на формирование микропобегов на экспланте в конце этапа введения в культуру *in vitro*. При этом влияние сорта земляники на регенерацию эксплантов и количество микропобегов на экспланте было незначительным. Методика использования МК в качестве эффективного антиоксиданта на этапе введения в культуру может быть использована для крупномасштабного размножения земляники садовой *in vitro*. Экологичность технологии получения МК из растительных отходов является заметным преимуществом его использования в технологиях *in vitro*.

Ключевые слова: земляника садовая, глутатион, 6-бензиламинопурин, тидиазурон, механокомпозит на основе растительных отходов, микроразмножение

Благодарности. Для проведения исследований использованы материалы биоресурсной научной «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте» Центрального сибирского ботанического сада СО РАН, USU 440534.

Финансирование. Работа по оценке влияния регуляторов роста на органогенез земляники садовой в условиях *in vitro* выполнена в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН № AAAA-A21-121011290025-2 по проекту «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами».

Исследование антиоксидантных свойств механокомпозита на основе биогенного диоксида кремния и флавоноидов зеленого чая на этапе введения апикальных меристем земляники в культуру *in vitro* выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках проекта № 19-44-540004.

Для цитирования: Амброс Е. В., Чертенкова Е. И., Толузакова С. Ю., Трофимова Е. Г., Новикова Т. И. Влияние антиоксидантов и регуляторов роста на органогенез побегов в культуре апикальных меристем *Fragaria* × *ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 549–560. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-549-560>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

**Effect of antioxidants and growth regulators
on shoot organogenesis in the apical meristem culture
of *Fragaria* × *ananassa* (Duchesne ex Weston)
Duchesne ex Rozier**

Elena V. Ambros*, Ekaterina I. Chertenkova**,
Svetlana Y. Toluzakova****, Elena G. Trofimova****,
Tatyana I. Novikova*

*Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

**National Research Tomsk State University,
Tomsk, Russian Federation

***National Research Tomsk State University,
Tomsk, Russian Federation

****Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS,
Novosibirsk, Russian Federation

Corresponding author: Elena V. Ambros, ambros_ev@mail.ru

Abstract. The initiation of strawberries into in vitro culture is known to be complicated by the inhibition of organogenesis by phenolic oxidation products. An important role in this process is given to the selection of growth regulators that increase meristematic cell activity and shoot proliferation at the stage of organogenesis induction. The present study aims to obtain a viable apical meristem culture of garden strawberry and to study the effect of different antioxidants (reduced glutathione (RG); a new preparation, i.e., a mechanical composite (MC) on the basis of biogenic silicon and green tea catechins and plant growth regulators (6-benzylaminopurine; thidiazuron) on the initiation of axillary shoot formation in strawberry meristem culture. Terminal buds containing an apical meristem and two leaf primordia isolated from the stolons of two garden strawberry cultivars (Sunny Meadow and Festival Chamomile) were used as primary explants for the initiation of strawberries into in vitro culture. It was found for the first time that the MC exhibits higher antioxidant activity as compared to reduced glutathione, reduces darkening of initial explants, as well as enhancing regeneration up to 13.0% at $p \leq 0.05$. Furthermore, the best effect on the formation of microshoots per explant is observed toward the end of material introduction into in vitro culture when combining the MC with growth regulators in the culture medium. Here, the effect of strawberry cultivar on explant regeneration and the number of microshoots per explant are insignificant. It is concluded that the procedure for using the MC as an effective antioxidant during material initiation into the culture can be applied to the large-scale in vitro propagation of garden strawberries. Moreover, the technology for obtaining the MC from plant waste is environmentally friendly, which is a significant advantage for its use in in vitro technologies.

Keywords: garden strawberry, glutathione, 6-benzylaminopurine, thidiazuron, plant waste-based mechanical composite, micropropagation

Acknowledgements: We used the material from the collection of the Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences – USU 440534 “Collection of living plants indoors and outdoors”.

Fundings: In vitro propagation of *F. × ananassa* microplants was carried out with the financial support of the budgetary project of the Central Siberian Botanical Garden, SB RAS no. AAAA-A21-121011290025-2 within the framework of the State Assignment. Study of antioxidant properties of mechanocomposite based on biogenic silicon and green tea flavonoids at the stage of isolated strawberry meristem in vitro introduction was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the Government of Novosibirsk Region as research project no. 19-44-540004.

For citation: Ambros E. V., Chertenkova E. I., Toluzakova S. Y., Trofimova E. G., Novikova T. I. Effect of antioxidants and growth regulators on shoot organogenesis in the apical meristem culture of *Fragaria* × *ana-*

nassa (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):549-560. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-549-560>.

ВВЕДЕНИЕ

Земляника садовая (*Fragaria* × *ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier) занимает лидирующие позиции в мире среди ягодных культур по площадям и продуктивности благодаря высокой способности к вегетативному размножению, скороплодности и быстрой отдаче урожая. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, мировое производство плодов земляники за последние 20 лет увеличилось в 2,5 раза¹. В связи с расширением производства земляники в мире растет потребность в получении высококачественного посадочного материала. В системе производства посадочного материала ягодных культур широко применяется клональное микроразмножение, к преимуществам которого относятся: возможность получения оздоровленных растений, высокий коэффициент размножения, проведение работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания культур. Известно, что включение методов *in vitro* в технологию производства посадочного материала перспективных сортов земляники повышает рентабельность производства по сравнению с традиционными методами примерно в 1,5–2 раза [1, 2]. Обязательным условием клонального микроразмножения является использование материала, полностью сохраняющего генетическую стабильность на всех этапах процесса – от экспланта до растений в поле. Этим требованиям удовлетворяют апексы и пазушные почки побегов, содержащие меристематические ткани. Основные проблемы при введении в культуру *in vitro* меристем земляники садовой связаны с большим процентом контаминации и ингибированием процессов органогенеза продуктами фенольного окисления [3]. Поэтому получение асептической культуры и подбор препаратов-антиоксидантов, уменьшающих некроз тканей при введении в культуру *in vitro*, являются необходимыми приемами в протоколах клонального микроразмножения. В предыдущих исследованиях нами были показаны рострегулирующая и адаптогенная активности механокомпозиата, полученного на основе аморфного диоксида кремния из шелухи риса и флавоноидов зеленого чая на этапах укоренения *in vitro* и адаптации *ex vitro* [4, 5]. Поскольку механокомпозиат содержит катехины и соединения кремния, обладающие антиоксидантными свойствами [6, 7], нами впервые проведено исследование потенциального антиоксидантного действия этого экологически безопасного препарата на начальных этапах введения в

культуру эксплантов земляники, результаты которого представлены в настоящей работе. Использование «зеленой химии» (механокомпозиата) в качестве ингибитора фенольного окисления в условиях *in vitro* может стать технологией, признанной и востребованной на мировом уровне.

Среди факторов, способствующих увеличению меристематической активности клеток и пролиферации побегов в индукционной фазе, важную роль играют регуляторы роста. Эффективным индуктором органогенеза у многих видов растений, в том числе плодово-ягодных, является тидиазурон (ТДЗ) – синтетический регулятор роста, производный дифенилмочевины [8–10]. По сравнению с цитокининами аминопуринового ряда ТДЗ при более низких концентрациях способствует адвентивному побегообразованию у *F. × ananassa* из листовых и флоральных эксплантов [11–18]. Однако эффект ТДЗ на индукцию органогенеза в культуре меристем земляники исследован на ограниченном количестве сортов [19, 20]. Поскольку морфогенетический потенциал культивируемых тканей во многом зависит от генотипа и условий культивирования, разработка эффективной и воспроизводимой системы регенерации под воздействием ТДЗ в условиях *in vitro* для сортов *F. × ananassa* – актуальная задача. В связи с этим целью данного исследования являлось получение жизнеспособной культуры апикальных меристем земляники садовой и изучение влияния разных типов антиоксидантов и регуляторов роста на процессы инициации пазушного побегообразования у эксплантов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биологическими объектами исследований являлись сорта земляники садовой (*F. × ananassa*): Солнечная полянка, Фестивальная ромашка, предоставленные В. И. Лутовым (Сельскохозяйственная артель «Сады Сибири», Новосибирская обл., пос. Ленинский). Изучаемые сорта характеризуются высокими показателями основных хозяйственно ценных признаков в условиях Западной Сибири [21, 22].

Для введения в культуру *in vitro* использовали столоны изучаемых сортов в начале их отращивания, которые брали с двухлетних опытных растений с начала июня до середины июля в 2019 и 2020 гг., произрастающих на экспериментальном участке лаборатории биотехнологии Центрального сибирского ботанического сада (ЦСБС) СО РАН (г. Новосибирск). Перед введением в культуру *in vitro* растительный материал отмывали в

¹FAOSTAT. Agricultural statistics database. 2017. Available from: <http://faostat.fao.org> [Accessed 08th April 2021].

течение 30 мин в проточной воде с использованием моющего средства Fairy (Procter & Gamble). Поверхностную стерилизацию проводили следующим образом: растительный материал погружали в 1,0%-й раствор гипохлорита натрия на 10 мин, затем дважды (по 10 мин) промывали в стерильной дистиллированной воде и погружали в 70%-й раствор этилового спирта на 2 с. Завершающим этапом стерилизации являлась обработка 0,1%-м раствором нитрата серебра в течение 5 мин с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде в течение 10 мин.

После стерилизации верхушку побега отсекали и помещали в чашку Петри с 0,25%-м раствором аскорбиновой кислоты, где под стереомикроскопом МСП-1 (АО «Ломо», Россия) при увеличении $\times 40$ изолировали эксплант. Для культивирования *in vitro* брали экспланты длиной около 0,5 мм, включающие конус нарастания с двумя листовыми примордиями. На первом этапе экспланты культивировали в течение 3-х суток без доступа света на питательной среде Гамборга – Эвелега (В5) [23], дополненной антиоксидантами и регуляторами роста. В качестве антиоксидантов использовали восстановленный глутатион (ВГ) в концентрации 100,0 мг/л или новый рострегулирующий препарат на основе биогенного диоксида кремния из шелухи риса и флавоноидов зеленого чая (механокомпозит, МК) в концентрации 20,0 мг/л (разработка Института химии твердого тела и механохимии СО РАН, г. Новосибирск). Химический состав МК, %: экстрактивные вещества – $16,3 \pm 1,1$; гемицеллюлоза – $22,3 \pm 0,8$; лигнин – $20,2 \pm 1,5$; целлюлоза – $38,9 \pm 2,0$; катехины – $1,4 \pm 0,2$; водорастворимый мономерный кремний – $34,0 \pm 0,7$ мг/л. Массовое соотношение рисовой шелухи и зеленого чая в МК составляет 10:1 [4]. Для инициации прямого органогенеза применяли синтетические цитокинины – тидиазурон (ТДЗ) в концентрации 0,02 мг/л или 6-бензиламинопури (БАП) в концентрации 1,0 мг/л. Концентрации ВГ и БАП показали свою эффективность в предыдущих исследованиях [24], концентрации МК и ТДЗ подобраны экспериментальным путем. В качестве контроля использовали безгормональную среду В5 с исследуемыми антиоксидантами.

По истечении 3-х суток культуры переносили в условия 16-часового фотопериода с интенсивностью освещения 4000 лк люминесцентными лампами дневного света при температуре 23 ± 2 °С. Через 7 суток культивирования подсчитывали процент стерильных эксплантов как отношение количества незараженных эксплантов к их общему количеству. В конце этапа введения в культуру *in vitro* (через 60 суток) оценивали процент регенерации (отношение количества эксплантов с развитыми побегами к общему количеству эксплантов) и количество микропобегов,

сформировавшихся на экспланте.

Оценку внешней морфологии эксплантов с индуцированными побегами проводили с использованием стереомикроскопа Carl Zeiss Stereo Discovery V12 с цветной цифровой камерой высокого разрешения AxioCam HRc (Германия) и программой AxioVision 4.8 (Германия) для получения, обработки и анализа изображений.

Экспланты вводили в культуру в количестве 45 штук для каждого варианта опыта и генотипа. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы StatSoft Statistica 10.0. Результаты представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($M \pm m$). Для сравнения средних значений независимых выборок использовали многограновый тест Дункана. Различия между средними значениями исследуемых показателей считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$. Оценку влияния факторов «антиоксидант», «регулятор роста» и «сорт» на процессы регенерации и органогенеза оценивали с помощью многофакторного дисперсионного анализа. Влияние факторов на исследуемые показатели считали статистически значимым при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При практическом использовании культуры изолированных тканей и органов для массового размножения земляники важно разработать эффективные протоколы получения растений-регенерантов из эксплантов различного происхождения. Апикальные меристемы являются часто используемым типом эксплантов для тиражирования растений в условиях *in vitro*, поскольку способствуют получению посадочного материала, оздоровленного от бактериальных, грибных и вирусных болезней, накапливающихся в растениях открытого грунта.

Высокая степень контаминации столонов земляники привела к необходимости использования последовательной стерилизации дезинфицирующими растворами этилового спирта, гипохлорита натрия и азотнокислого серебра. Так, применяемый режим стерилизации растительного материала оказался эффективным, выход неинфицированных апикальных меристем составил $51,4 \pm 9,7$ и $65,0 \pm 4,1$ % для сортов Солнечная полянка и Фестивальная ромашка соответственно. Кроме того, использованный в нашем эксперименте режим стерилизации не только освобождал экспланты от контаминации, но и не подавлял их развитие, способность клеток растений к регенерации сохранялась (рис. 1). Однако основной проблемой на этапе инициации органогенеза *in vitro* из апикальных меристем земляники является окисление вторичных соединений (фенолы, терпены и другие вещества) фенолазами [25], приводящее к потемнению

изолированных тканей эксплантов. В свою очередь продукты окисления полифенолов обычно ингибируют деление и рост клеток, что ведет к гибели первичного экспланта или к уменьшению способности тканей к регенерации пазушных почек [26]. Контролировать накопление полифенолов можно добавлением антиоксидантов в питательную среду. В наших экспериментах для снижения токсичного действия полифенолов на этапе введения в культуру *in vitro* меристемы земляники изолировали в растворе аскорбиновой кислоты, затем культивировали в темноте, а также включали в состав питательных сред наиболее часто используемый антиоксидант – ВГ, и новый препарат из возобновляемого растительного сырья – МК. В ходе экспериментов определено, что меристемы сорта Солнечная полянка на питательных средах без регуляторов роста обладали меньшим регенерационным потенциалом (от 0 до 11,2% в зависимости от типа антиоксиданта) по сравнению с меристемами сорта Фестивальная ромашка (от 30,5 до 38,9%) (рис. 1). Определенная изменчивость регенерации при введении апикальных меристем *in vitro* может быть обусловлена индивидуальными особенностями сортов, связанными с интенсивностью выделения фенолов в питательную среду, и, как следствие, жизнеспособностью эксплантов при дальнейшем культивировании. Влияние генотипа на способность к регенерации, его реак-

ция на компоненты питательной среды подтверждают многие исследователи, поэтому индивидуальная разработка эффективных и воспроизводимых систем регенерации для каждого сорта является обоснованным этапом в работах по клональному микроразмножению [27–30]. Использование МК в качестве антиоксиданта увеличивало регенерационную способность (до 13,0%) апикальных меристем обоих сортов по сравнению с ВГ ($p < 0,05$). Среди биологически активных веществ, содержащихся в зеленом чае, основными антиоксидантными компонентами являются катехины, нейтрализующие активные формы кислорода [31]. Можно предположить, что применение МК изменяет окислительный метаболизм и уменьшает предрасположенность тканей эксплантов земляники к повреждающему действию продуктов фенольного окисления в условиях *in vitro*.

Среди факторов, способствующих увеличению меристематической активности клеток и пролиферации побегов, наиболее эффективным является использование регуляторов роста цитокининового типа в индукционной фазе регенерации эксплантов. Хотя в коммерческом размножении земляники наиболее часто используемым цитокинином является БАП [32, 33], в последнее время благодаря эффективности внимание к себе привлекает ТДЗ как мощный триггер органогенеза у плодово-ягодных растений [10].»

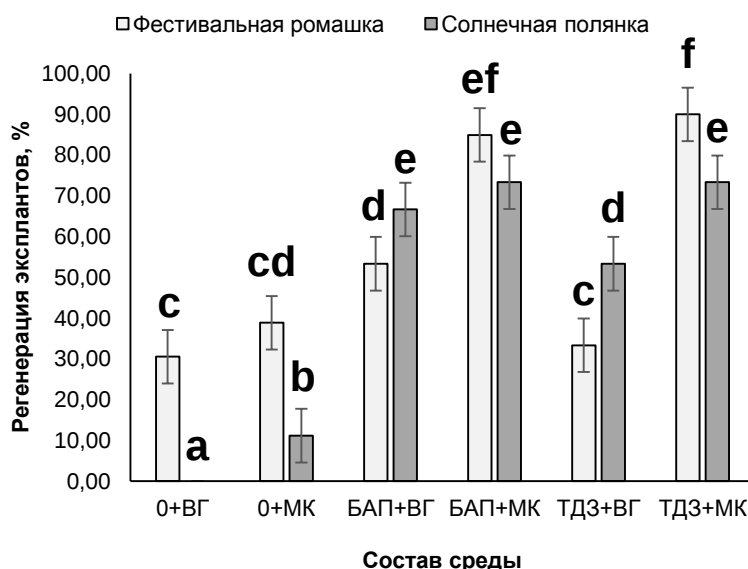


Рис. 1. Влияние антиоксидантов (ВГ, МК) и регуляторов роста (БАП, ТДЗ, 0 – среда без регуляторов роста) на регенерацию эксплантов сортов *F. × ananassa* Солнечная полянка и Фестивальная ромашка через 60 суток культивирования. Данные представлены в виде $M \pm m$; значения в столбцах, обозначенные разными буквами, имеют статистически значимое отличие друг от друга в соответствии с тестом Дункана ($p < 0,05$)

Fig. 1. Effect of antioxidants (GSH, MC) and plant growth regulators (BAP, TDZ, 0 – medium without plant growth regulators) on the regeneration rate of *F. × ananassa* explants (cvs. Solnechnaya polyanka and Festival'naya romashka) after 60 days of cultivation. Data are presented as $M \pm m$; for variables marked with different letters, the difference is statistically significant according to the Duncan test ($p < 0.05$).
 On the X-axis – Medium composition; on the Y-axis – Regeneration of explants, %

как мощный триггер органоогенеза у плодово-ягодных растений [10]. Эффективность ТДЗ в качестве индуктора морфоогенеза связывают с его способностью ингибировать действие цитокининооксидазы – фермента, осуществляющего процесс необратимой деградации фитогормонов цитокининовой природы [34]. В нашем эксперименте использование как ТДЗ, так и БАП в составе питательных сред при введении в культуру *in vitro* стимулировало процессы регенерации и пролиферации в тканях первичных эксплантов у изучаемых сортов (рис. 2). Максимальное число микропобегов на экспланте (от 5 ± 1 до 6 ± 1 штук в зависимости от сорта) получено на средах с ТДЗ (рис. 3, с, см. рис. 2), что подтверждает промоторный эффект ТДЗ на морфогенетический ответ для ягодных культур [9]. При применении БАП в качестве индуктора органоогенеза число микропобегов для сорта Фестивальная ромашка составило 3 ± 1 шт., для сорта Солнечная полянка – 5 ± 1 шт. (см. рис. 2).

Следует отметить, что регенерация апикальных меристем исследуемых сортов протекала исключительно по пути прямого органоогенеза (рис. 3, б). Выявлены сортовые различия по скорости морфогенного ответа: первые изменения на поверхности эксплантов (незначительное разрастание ткани) отмечали через 7 суток культивирования у растений сорта Фестивальная ромашка, через 7–10 суток – у растений сорта Солнечная полянка. Развитие основного побега и образование пазушных микропочек у растений данных сор-

тов наблюдали через 20 и 25 суток соответственно (см. рис. 3, б). На 35–40-е сутки культивирования почки давали начало конгломератам микропобегов (см. рис. 3, с). На безгормональных средах отмечено развитие только основного побега.

Результаты многофакторного дисперсионного анализа показали, что на этапе введения в культуру *in vitro* земляники садовой на показатель «процент регенерации эксплантов» статистически значимое влияние оказывают все три изученных фактора ($p < 0,05$) – «сорт», «регулятор роста» и «антиоксидант», также статистически значимое влияние на этот показатель обнаруживают сочетания факторов «сорт + регулятор роста», «сорт + антиоксидант» и «регулятор роста + антиоксидант» (таблица). Наибольшее влияние на процент регенерации эксплантов оказывает фактор «регулятор роста» ($F = 66,20$), в меньшей степени – фактор «антиоксидант» ($F = 34,89$). Фактор «сорт» и вышеуказанные сочетания факторов оказывают на данный показатель значительно меньшее влияние ($F = 7,13$ и менее). На показатель «число микропобегов» из трех исследованных факторов статистически значимое влияние обнаруживают два – «регулятор роста» и «антиоксидант», причем в большей степени имеет значение вид используемого регулятора роста ($F = 12,11$), в меньшей – вид используемого антиоксиданта ($F = 6,23$). Фактор «сорт», а также сочетание факторов статистически значимого влияния на исследуемый показатель не обнаруживают.

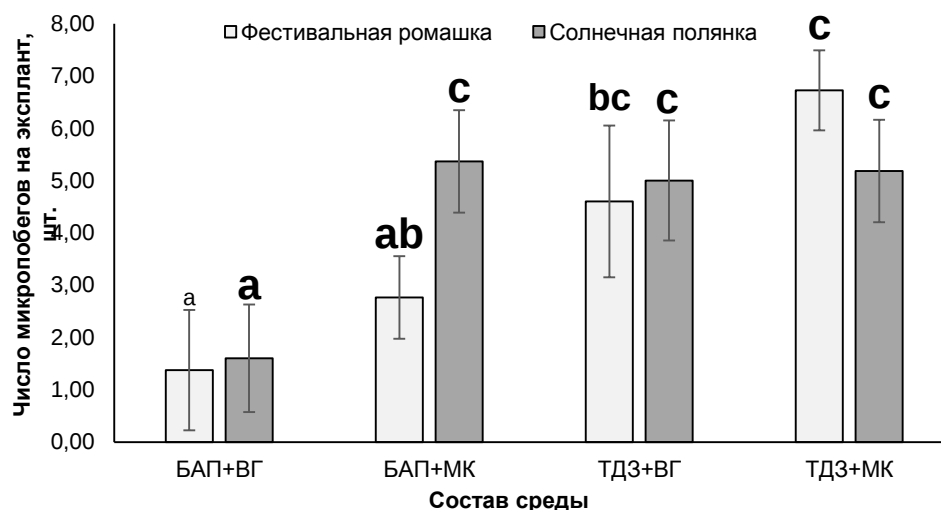


Рис. 2. Влияние антиоксидантов (ВГ, МК) и регуляторов роста (БАП, ТДЗ) на среднее число микропобегов, формирующихся на экспланте у сортов *F. × ananassa* Солнечная полянка и Фестивальная ромашка через 60 суток культивирования. Данные представлены в виде $M \pm m$; значения в столбцах, обозначенные разными буквами, имеют статистически значимое отличие друг от друга в соответствии с тестом Дункана ($p < 0,05$)

Fig. 2. Effect of antioxidants (GSH, MC) and plant growth regulators (BAP, TDZ) on the average number of microshoots per explant of *F. × ananassa* (cvs. Solnechnaya polyanka and Festival'naya romashka) after 60 days of cultivation. Data are presented as $M \pm m$; for variables marked with different letters, the difference is statistically significant according to the Duncan test ($p < 0.05$)
 On the X-axis – Medium composition; on the Y-axis – Number of microshoots per explant

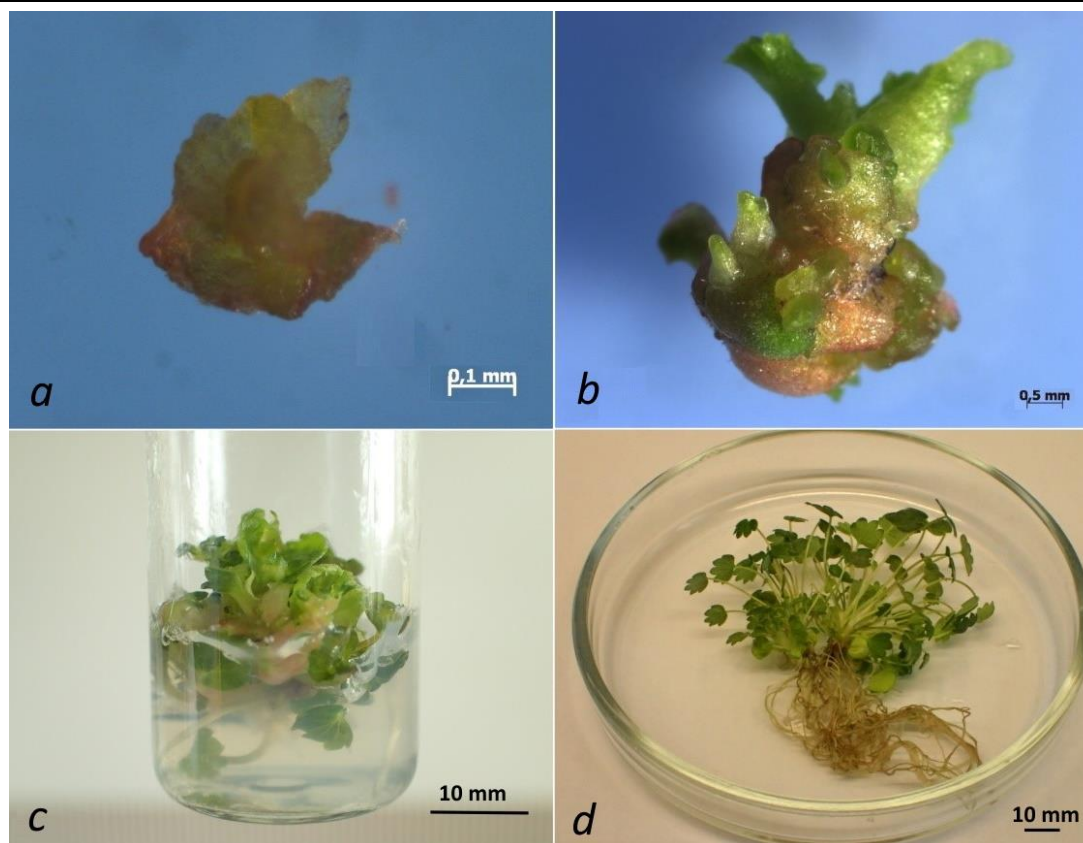


Рис. 3. Регенерация пазушных микропобегов из апикальных меристем у сорта *F. x ananassa* Солнечная полянка под действием 20,0 мг/л МК и 0,02 мг/л ТДЗ:

a – апикальная меристема (первичный эксплант); *b* – регенерация микропочек на поверхности первичного экспланта через 25 суток культивирования; *c* – конгломерат микропобегов через 40 суток; *d* – микропобеги через 60 суток

Fig. 3. Regeneration of axillary microshoots from the apical meristems of *F. x ananassa* (cv. Solnechnaya polyanka) under 20.0 mg/l MC and 0.02 mg/l TDZ:

a – apical meristem (primary explant); *b* – regeneration of microbuds on the surface of the primary explant after 25 days of cultivation; *c* – conglomerate of microshoots after 40 days; *d* – microshoots after 60 days

Результаты многофакторного дисперсионного анализа влияния факторов микроразмножения на показатели эффективности введения в культуру *in vitro* земляники садовой

Results of variance analysis of micropropagation factors influence on the efficiency of cultivated strawberry *in vitro* introduction

Факторы и их сочетания	Показатели эффективности введения в культуру <i>in vitro</i>			
	Регенерация эксплантов, %		Число микропобегов на эксплант, шт.	
	Значение критерия Фишера, <i>F</i>	Достигнутый уровень значимости, <i>p</i>	Значение критерия Фишера, <i>F</i>	Достигнутый уровень значимости, <i>p</i>
Регулятор роста	66,20*	0,000000	12,11*	0,000814
Антиоксидант	34,89*	0,000004	6,23*	0,014639
Сорт	5,46*	0,028179	0,32	0,574776
Сорт + регулятор роста	7,13*	0,003708	1,76	0,188431
Сорт + антиоксидант	6,67*	0,016357	0,02	0,885023
Регулятор роста + антиоксидант	4,91*	0,016225	0,91	0,343240
Сорт + регулятор роста + антиоксидант	2,38	0,113763	2,08	0,152737

*Значения *F* для факторов и их сочетаний, влияние которых на исследуемые показатели статистически значимо ($p < 0,05$).

Результаты дисперсионного анализа позволяют сделать заключение, что самыми важными факторами, влияющими на эффективность введе-

ния в культуру *in vitro* изученных сортов земляники садовой, являются типы используемых регуляторов роста и антиоксидантов. При этом сортовая

принадлежность эксплантов малозначима. В целом использование в качестве антиоксиданта МК в сочетании с любым из исследованных регуляторов роста способствует более высокой регенеративной активности эксплантов, поэтому можно рекомендовать использовать МК в качестве эффективного антиоксиданта на этапе введения в культуру *in vitro* земляники садовой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненных исследований оптимизированы приемы получения жизнеспособного исходного материала из апикальных меристем *F. × ananassa* сортов Солнечная полянка и Фестивальная ромашка в условиях *in vitro*, осно-

ванные на действии регуляторов роста БАП и ТДЗ и антиоксидантов ВГ и МК. Использование МК в сочетании с ТДЗ значительно препятствовало окислению фенольных компонентов, способствовало увеличению регенерации эксплантов и интенсивной стимуляции образования пазушных микропобегов (в среднем 5–7 шт. на эксплант). Представленная система регенерации пазушных побегов из апикальных меристем земляники садовой с добавлением в состав питательной среды МК на основе антиоксидантов растительного происхождения и ТДЗ может быть полезна коммерческим предприятиям, использующим для размножения растений технологии *in vitro*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Расторгуев С. Л. Культура изолированных тканей и органов в селекции плодовых растений. Мичуринск: МичГАУ, 2009. 170 с.
2. Беликова Н. А., Белякова Л. В., Высоцкий В. А., Алексеенко Л. В. Экономическая эффективность выращивания рассады земляники с использованием биотехнологических приемов // Садоводство и виноградарство. 2011. N 5. С. 45–48.
3. Palei S., Das A. K., Rout G. R. *In vitro* studies of strawberry – an important fruit crop: a review // The Journal of Plant Science Research. 2015. Vol. 31, no. 2. P. 115–131.
4. Амброс Е.В., Коцупий О.В., Карпова Е.А., Трофимова Е.Г., Зайцева Ю.Г., Новикова Т.И. Адаптивный ответ регенерантов *Fragaria ananassa* Duch. под действием механокомпозита на основе аморфного диоксида кремния и флавоноидов зелёного чая в условиях *in vitro* // Теоретическая и прикладная экология. 2019. N 4. С. 116–122. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-4-116-122>.
5. Ambros E. V., Toluzakova S. Y., Shrairer L. S., Trofimova E. G., Novikova T. I. An innovative approach to *ex vitro* rooting and acclimatization of *Fragaria × ananassa* Duch. microshoots using a biogenic silica and green-tea-catechin-based mechanocomposite // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 2018. Vol. 54, no. 4. P. 436–443. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9894-1>.
6. Sahebi M., Hanafi M. M., Azizi P. Application of silicon in plant tissue culture // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 2016. Vol. 52, no. 3. P. 226–232. <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9757-6>.
7. Kulbat K. The role of phenolic compounds in plant resistance // Biotechnology and Food Sciences. 2016. Vol. 80, no. 2. P. 97–108.
8. Bhagwat B., Lane W. D. *In vitro* shoot regenerations from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweetheart' // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2004. Vol. 78, no. 2. P. 173–181. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000022552.12449.71>.
9. Meng R. G., Chen T. H. H., Finn C. E., Li Y. Improving *in vitro* plant regeneration from leaf and petiole explants of 'Marion' blackberry // HortScience. 2004. Vol. 39, no. 2. P. 316–320. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.2.316>.
10. Debnath S. C. Thidiazuron in micropropagation of small fruits. In: Ahmad N., Faisal M. (eds). *Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator*. Springer, Singapore. 2018. P. 139–158. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_6.
11. Passey A. J., Barrett K. J., James D. J. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) using a range of explant types // Plant Cell Reports. 2003. Vol. 21, no. 5. P. 397–401. <https://doi.org/10.1007/S00299-002-0530-4>.
12. Debnath S. C. Strawberry sepal: another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 2005. Vol. 41, no. 5. P. 671–676. <https://doi.org/10.1079/IVP2005688>.
13. Landi L., Mezzetti B. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria* // Plant Cell Reports. 2006. Vol. 25, no. 4. P. 281–288. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0066-5>.
14. Debnath S. C., Teixeira da Silva J. A. Strawberry culture *in vitro*: applications in genetic transformation and biotechnology // Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. 2007. Vol. 1, no. 1. 12 p.
15. Husaini A., Abidin M. Interactive effect of light, temperature and TDZ on the regeneration potential of leaf discs of *Fragaria × ananassa* Duch. // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 2007. Vol. 43, no. 6. P. 576–584. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9048-3>.
16. Debnath S. C. Developing a scale-up system for the *in vitro* multiplication of thidiazuron-induced strawberry shoots using a bioreactor // Canadian Journal of Plant Science. 2008. Vol. 88, no. 4. P. 737–746. <https://doi.org/10.4141/CJPS07147>.
17. Murti R. H., Debnath S. C., Yeoung Y. R. Effect of high concentration of thidiazuron (TDZ) combined with 1H-indole-3-butyric acid (IBA) on Albion

strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) cultivar plantlets induction // African Journal of Biotechnology. 2012. Vol. 11, no. 81. P. 14696–14702. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1047>.

18. Cappelletti R., Sabbadini S., Mezzetti B. The use of TDZ for the efficient *in vitro* regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars // Scientia Horticulturae. 2016. Vol. 207, no. 1. P. 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.016>.

19. Fatemeh H., Mehran A. A., Ghizan S., Azmi A. R., Hussain K. Micropropagation of strawberry cultivar Camarosa: prolific shoot regeneration from *in vitro* shoot tips using thidiazuron with N6-benzylamino-purine // Hortscience. 2010. Vol. 45, no. 3. P. 453–456.

20. Quiroz K. A., Berríos M., Carrasco B., Retamales J. B., Caligari P. D. S., García-González R. Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.) // Biological Research. 2017. Vol. 50, no. 1. Article number 20. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0125-8>.

21. Стольникова Н. П. Культура земляники в Западной Сибири. Барнаул: ИП И. А. Колмогоров, 2014. 182 с.

22. Петрук В. А., Боровикова Т. В., Аполинарьева И. К. Интродукция сортов земляники крупноплодной в условиях лесостепи Западной Сибири // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2016. N 6. С. 40–46.

23. Gamborg O. L., Eveleigh D. E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // Canadian Journal of Biochemistry. 1968. Vol. 46, no. 5. P. 417–421. <https://doi.org/10.1139/o68-063>.

24. Амброс Е. В., Зайцева Ю. Г., Красников А. А., Новикова Т. И. Оптимизация систем регенерации микропобегов генотипов *Fragaria* × *ananassa* (Rosaceae), перспективных для сибирского региона // Растительный мир Азиатской России. 2017. N 4. С. 73–80. [https://doi.org/10.21782/RMAR.1995-2449-2017-4\(73-80\)](https://doi.org/10.21782/RMAR.1995-2449-2017-4(73-80)).

25. Баймухаметова Э. А., Кулуев Б. Р. Потем-

нение растительных тканей при культивировании *in vitro* и способы его предотвращения // Биотехнология. 2020. Т. 36, N 2. С. 26–42. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-2-26-42>.

26. Kichaoui A. Y. *In vitro*, propagation of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) through organogenesis via runner tips // Annals of Plant Sciences. 2014. Vol. 3, no. 3. P. 619–627.

27. Деменко В. И. Проблемы и возможности микрклонального размножения садовых растений // Известия ТСХА. 2005. Вып. 2. С. 48–58.

28. Расторгуев С. Л. Разработка приемов размножения земляники в системе *in vitro* // Вестник МичГАУ. 2012. N 1, ч. 1. С. 10–13.

29. Мацнева О. В., Ташматова Л. В., Джафарова В. Е. Пролиферативная активность сортов земляники садовой в культуре *in vitro* // Современное садоводство. 2016. N 1. С. 77–82. [Электронный ресурс]. URL: journal-vniispk.ru (08.04.2021).

30. Высоцкий В. А. Регенерационная способность эксплантов земляники различного происхождения // Плодоводство и ягодоводство России. 2014. Т. 40, N 1. С. 98–103.

31. Musial C., Kuban-Jankowska A., Gorska-Ponikowska M. Beneficial properties of green tea catechins // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21, no. 5. P. 1744. <https://doi.org/10.3390/ijms21051744>.

32. Шорников Д. Г., Брюхина С. А., Муратова С. А., Янковская М. Б., Папихин Р. В. Оптимизация условий культивирования *in vitro* ягодных и декоративных культур // Вестник Тамбовского университета. Серия: естественные и технические науки. 2010. Т. 15, N 2. С. 640–645.

33. Кухарчик Н. Получение посадочного материала плодовых и ягодных растений *in vitro* // Наука и инновации. 2019. N 6. С. 17–21.

34. Murthy B. N. S., Murch S. J., Saxena P. K. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 1998. N 34. P. 267–275. <https://doi.org/10.1007/BF02822732>.

REFERENCE

1. Rastorguev S. L. *Culture of isolated tissues and organs in the selection of fruit plants*. Michurinsk: Izdatel'stvo Michurinskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta; 2009. 170 p. (In Russian).

2. Belikova N. A., Belyakova L. V., Vysotskiy V. A., Alekseenko L. V. Economic efficiency of growing strawberry seedlings using biotechnological techniques. *Sadovodstvo i vinogradarstvo = Horticulture and Viticulture*. 2011;5:45–48. (In Russian).

3. Palei S., Das A. K., Rout G. R. *In vitro* studies of strawberry – an important fruit crop: a review. *The Journal of Plant Science Research*. 2015;31(2):115–131.

4. Ambros E. V., Kotsupy O. V., Karpova E. A., Trofimova E. G., Zaytseva Y. G., Novikova T. I. *In vitro* adaptive responses of *Fragaria ananassa*

Duch. plantlets induced by the mechanocomposite based on amorphous silica and flavonoids of green tea. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya = Theoretical and Applied Ecology*. 2019;4:116–122. (In Russian). <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-4-116-122>.

5. Ambros E. V., Toluzakova S. Y., Shraimer L. S., Trofimova E. G., Novikova T. I. An innovative approach to *ex vitro* rooting and acclimatization of *Fragaria* × *ananassa* Duch. microshoots using a biogenic silica- and green-tea-catechin-based mechanocomposite. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2018;54(4):436–443. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9894-1>.

6. Sahebi M., Hanafi M. M., Azizi P. Application of silicon in plant tissue culture. *In Vitro Cellular &*

- Developmental Biology – Plant*. 2016;52(3):226–232. <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9757-6>.
7. Kulbat K. The role of phenolic compounds in plant resistance. *Biotechnology and Food Sciences*. 2016;80(2):97–108.
8. Bhagwat B., Lane W. D. *In vitro* shoot regenerations from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweetheart'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2004;78(2):173–181. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000022552.12449.71>.
9. Meng R. G., Chen T. H. H., Finn C. E., Li Y. Improving *in vitro* plant regeneration from leaf and petiole explants of 'Marion' blackberry. *HortScience*. 2004;39(2):316–320. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.2.316>.
10. Debnath S. C. Thidiazuron in micropropagation of small fruits. In: Ahmad N., Faisal M. (eds.) *Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator*. Springer, Singapore; 2018, p. 139–158. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_6.
11. Passey A. J., Barrett K. J., James D. J. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) using a range of explant types. *Plant Cell Reports*. 2003;21(5):397–401. <https://doi.org/10.1007/S00299-002-0530-4>.
12. Debnath S. C. Strawberry sepal: another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2005;41(5):671–676. <https://doi.org/10.1079/IVP2005688>.
13. Landi L., Mezzetti B. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. *Plant Cell Reports*. 2006;25(4):281–288. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0066-5>.
14. Debnath S. C., Teixeira da Silva J. A. Strawberry culture *in vitro*: applications in genetic transformation and biotechnology. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*. 2007;1(1). 12 p.
15. Husaini A., Abdin M. Interactive effect of light, temperature and TDZ on the regeneration potential of leaf discs of *Fragaria × ananassa* Duch. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2007;43(6):576–584. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9048-3>.
16. Debnath S. C. Developing a scale-up system for the *in vitro* multiplication of thidiazuron-induced strawberry shoots using a bioreactor. *Canadian Journal of Plant Science*. 2008;88(4):737–746. <https://doi.org/10.4141/CJPS07147>.
17. Murti R. H., Debnath S. C., Yeoung Y. R. Effect of high concentration of thidiazuron (TDZ) combined with 1H-indole-3-butanoic acid (IBA) on Albion strawberry (*Fragaria × ananassa*) cultivar plantlets induction. *African Journal of Biotechnology*. 2012;1(81):14696–14702. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1047>.
18. Cappelletti R., Sabbadini S., Mezzetti B. The use of TDZ for the efficient *in vitro* regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae*. 2016;207(1):117–124. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.016>.
19. Fatemeh H., Mehran A. A., Ghizan S., Azmi A. R., Hussain K. Micropropagation of strawberry cultivar Camarosa: prolific shoot regeneration from *in vitro* shoot tips using thidiazuron with N6-benzylamino-purine. *Hortscience*. 2010;45(3):453–456.
20. Quiroz K. A., Berríos M., Carrasco B., Retamales J. B., Caligari P. D. S., García-González R. Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.). *Biological Research*. 2017;50(1). Article number 20. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0125-8>.
21. Stol'nikova N. P. *Strawberry culture in Western Siberia*. Barnaul: Izdatel'stvo individual'nogo predprinimatel'stva I. A. Kolmogorov; 2014. 182 p. (In Russian).
22. Petruk V. A., Borovikova T. V., Apolinar'eva I. K. Introduction of garden strawberry cultivars in West Siberian forest steppe. *Sibirskii Vestnik Sel'skokhozyaistvennoi Nauki = Siberian Herald of Agricultural Science*. 2016;6:40–46. (In Russian).
23. Gamborg O. L., Eveleigh D. E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1968;46(5):417–421. <https://doi.org/10.1139/o68-063>.
24. Ambros E. V., Zaytseva Yu. G., Krasnikov A. A., Novikova T. I. Optimization of microshoots regeneration systems of *Fragaria × ananassa* (Rosaceae) genotypes perspective for Siberian region. *Rastitel'nyi mir Aziatskoi Rossii = Flora and Vegetation of Asian Russia*. 2017;4:73–80. (In Russian). [https://doi.org/10.21782/RMAR1995-2449-2017-4\(73-80\)](https://doi.org/10.21782/RMAR1995-2449-2017-4(73-80)).
25. Baimukhametova E. A., Kuluev B. R. Darkening of plant tissues during *in vitro* cultivation and methods for its prevention. *Biotehnologiya = Biotechnology*. 2020;36(2):26–42. (In Russian). <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-2-26-42>.
26. Kichaoui A. Y. *In vitro*, propagation of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) through organogenesis via runner tips. *Annals of Plant Sciences*. 2014;3(3):619–627.
27. Demenko V. I. Problems and possibilities of micropropagation of garden plants. *Izvestiya Timiryazevskoi Sel'skokhozyaistvennoi Akademii = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy (TAA)*. 2005;2:48–58. (In Russian).
28. Rastorguyev S. L. Development of strawberry propagation methods in system *in vitro*. *Vestnik Michurinskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of Michurinsk State Agrarian University*. 2012;1(1):10–13. (In Russian).
29. Matzneva O. V., Tashmatova L. V., Dzhafarova V. E. Proliferative activity of strawberry cultivars *in vitro*. *Sovremennoe Sadovodstvo = Contemporary Horticulture*. 2016;1:77–82. Available from: journal-vniispk.ru [Accessed 08th April 2021]. (In Russian).

30. Vysotskiy V. A. Regenerative capacity of strawberry explants of different origination. *Plodovodstvo i Yagodovodstvo Rossii = Pomiculture and Small Fruits Culture In Russia*. 2014;40(1):98–103. (In Russian).

31. Musial C., Kuban-Jankowska A., Gorska-Ponikowska M. Beneficial properties of green tea catechins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(5):1744. <https://doi.org/10.3390/ijms21051744>.

32. Shornikov D. G., Bryukhina S. A., Muratova S. A., Yankovskaya M. B., Papikhin R. V. *In vitro* conditions improvement for berry and ornamental plants micro-

propagation. *Vestnik Tambovskogo Universiteta. Seriya: Estestvennye i Tekhnicheskie Nauki = Tambov University Reports. Series Natural and Technical Sciences*. 2010;1(2):640–645. (In Russian)

33. Kuharchik N. Fruit and soft fruit plants propagation *in vitro*. *Nauka i Innovatsii = The Science and Innovations*. 2019;6:17–21. (In Russian).

34. Murthy B. N. S., Murch S. J., Saxena P. K. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 1998;34:267–275. <https://doi.org/10.1007/BF02822732>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Е. В. Амброс,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Центральный сибирский ботанический сад
СО РАН,
630090, г. Новосибирск,
ул. Золотодолинская, 101,
Российская Федерация,
ambros_ev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2119-6503>

Е. И. Чертенкова,

магистрант,
Национальный исследовательский Томский
государственный университет,
634050, г. Томск, пр-т Ленина, 36,
Российская Федерация,
chertenkova_kate@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1785-6257>

С. Ю. Толузакова,

к.б.н., доцент,
Национальный исследовательский Томский
государственный университет,
634050, г. Томск, пр-т Ленина, 36,
Российская Федерация;
доцент кафедры агрономии и технологии
производства и переработки
сельхозпродукции,
Томский сельскохозяйственный институт –
филиал Новосибирского государственного
аграрного университета,
634009, г. Томск, ул. К. Маркса, 19,
Российская Федерация,
svetasana@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-0016-0779>

Е. Г. Трофимова,

к.х.н., научный сотрудник,
Институт химии твердого тела и механохимии
СО РАН,
630128, г. Новосибирск, ул. Кутателадзе, 18,
Российская Федерация,
shapolovaelena@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6769-3724>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena V. Ambros,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Central Siberian Botanical Garden SB RAS,
101, Zolotodolinskaya St., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
ambros_ev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2119-6503>

Ekaterina I. Chertenkova,

Master Student,
National Research Tomsk State University,
36, Lenin Ave., Tomsk, 634050,
Russian Federation,
chertenkova_kate@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1785-6257>

Svetlana Y. Toluzakova,

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
National Research Tomsk State University,
36, Lenin Ave., Tomsk, 634050,
Russian Federation;
Associate Professor,
Department of Agronomy and Technology
of Production and Processing
of Agricultural Products,
Tomsk Agricultural Institute Branch
of Novosibirsk State Agricultural University,
19, Karl Marks St., Tomsk, 634009,
Russian Federation,
svetasana@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-0016-0779>

Elena G. Trofimova,

Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
Institute of Solid State Chemistry
and Mechanochemistry SB RAS,
18, Kutateladze St., Novosibirsk, 630128,
Russian Federation,
shapolovaelena@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6769-3724>

Т. И. Новикова,

д.б.н., заведующая лабораторией
биотехнологии,
Центральный сибирский ботанический сад
СО РАН,
630090, г. Новосибирск,
ул. Золотодолинская, 101,
Российская Федерация,
tin27@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6690-1878>

Tatyana I. Novikova,

Dr. Sci. (Biology.), Head of the Laboratory
of Biotechnology,
Central Siberian Botanical Garden SB RAS,
101, Zolotodolinskaya St., Novosibirsk, 630090,
Russian Federation,
tin27@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6690-1878>

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.*

*Поступила в редакцию 22.06.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.*

*The article was submitted 22.06.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.*

Научная статья

УДК 574.6.663.1

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-561-569>



Оценка технологических показателей стационарного состояния технологического процесса синтеза с нелинейной кинетикой роста микроорганизмов

Юлия Львовна Гордеева*, Борис Александрович Ульянов**,
Елена Львовна Гордеева***

*Московская государственная академия ветеринарной медицины

и биотехнологии – МВА им. К. И. Скрябина, г. Москва, Российская Федерация

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

***Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева,

г. Москва, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Гордеева Юлия Львовна, gordulia32@gmail.com

Аннотация. Разработаны теоретические основы расчета технологических показателей стационарного состояния биотехнологического процесса с нелинейной кинетикой роста микроорганизмов. Целью разработки являлось получение общей методологической основы для вычисления входных показателей, определяющих реальное осуществление технологии с учетом всех возможных ограничений на концентрацию поступающего субстрата, S_f , г/л, и величину потока, D , ч⁻¹. Разработка теории базировалась на использовании математической модели одного из наиболее распространенных процессов получения молочной кислоты. Математическая модель включает три уравнения материального баланса (по биомассе, субстрату и продукту) и уравнение кинетики роста микроорганизмов. Получены расчетные соотношения для вычисления предельного значения величины потока, $D^{пред}$, при заданном S_f , соотношения для максимального и минимального значения S_f , а также показатели S_f и D , обеспечивающие максимальное значение продуктивности, Q_p , г/(л·ч), где $Q_p = PD$ (P – концентрация продукта, г/л). Разработаны соотношения для расчета показателей возможной реализации процесса для двух вариантов при одном и том же значении Q_p : при заданном S_f вычисляются два значения D и при заданном D вычисляются два значения S_f . Приведен численный эксперимент с использованием констант математической модели, подтвержденных исследованиями зарубежных ученых. Численный эксперимент проиллюстрирован портретом зависимости S_f от D , определяющим область допустимых значений S_f и D , расчет показателей по которой разделен на части по S_f . Приведены расчетные формулы по каждой из частей. В заключении отмечено, что разработанная теоретическая база носит достаточно общий характер и может быть распространена на технологии биотехнологических процессов с другими кинетическими соотношениями, штаммами микроорганизмов, образующими побочные продукты и использующими сырье, из которого воспроизводится субстрат в процессе синтеза.

Ключевые слова: молочная кислота, математическое моделирование, множественность, стационарное состояние

Для цитирования: Гордеева Ю. Л., Ульянов Б. А., Гордеева Е. Л. Оценка технологических показателей стационарного состояния технологического процесса синтеза с нелинейной кинетикой роста микроорганизмов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 561–569. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-561-569>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Estimation of parameters characterizing a steady-state synthesis process with nonlinear microorganism growth kinetics

Yuliya L. Gordeeva*, Boris A. Ul'yanov**,
Elena L. Gordeeva***

© Гордеева Ю. Л., Ульянов Б. А., Гордеева Е. Л., 2021

*Moscow State Academy of Veterinary Medicine

and Biotechnology –MVA named after K. I. Skryabin, Moscow, Russian Federation

**Angarsk State Technical University, Angarsk, Russian Federation

***Mendeleev University of Chemical Technology,

Moscow, Russian Federation

Corresponding author: Yuliya L. Gordeeva, gordulia32@gmail.com

Abstract. The paper describes a theoretical basis developed for estimating the parameters of a steady-state biotechnological process characterized by nonlinear microorganism growth kinetics. This study aimed to obtain a common methodological basis for estimating input parameters that determine actual technology implementation, taking into account all possible restrictions on the concentration of incoming substrate S_f (g/l) and dilution rate D (h^{-1}). The theory development was based on a mathematical model describing one of the most common processes of lactic acid production. This mathematical model includes three mass balance equations (for biomass, substrate, and product), as well as an equation of microorganism growth kinetics. The study established relations for calculating the ultimate value of the dilution rate D^{ult} at a given S_f , relations for the maximum and minimum values of S_f , as well as S_f and D providing the maximum productivity value Q_p , g/(l·h), where $Q_p = PD$ (P – product concentration, g/l). These relations were designed to calculate the parameters of possible process implementation for two options at the same value of Q_p : two values of D calculated for a given S_f and two values of S_f calculated for a given D . A numerical experiment is described using the constants of the mathematical model confirmed by foreign studies. This numerical experiment is illustrated using an S_f - D dependence pattern determining an acceptable value range for S_f and D , with the separate calculation of parameters according to S_f sections. For each of these sections, calculation formulas are provided. It is concluded that the developed theoretical basis is sufficiently general in nature to be applied to biotechnological processes that involve other kinetic relations, as well as microorganism strains creating by-products and using raw materials that are employed to reproduce the substrate in the process of synthesis.

Keywords: lactic acid, mathematical modeling, multiplicity, steady state

For citation: Gordeeva Y. L., Ul'yanov B. A., Gordeeva E. L. Estimation of parameters characterizing a steady-state synthesis process with nonlinear microorganism growth kinetics. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4): 561-569. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-561-569>.

ОБОЗНАЧЕНИЯ

D – величина потока, $ч^{-1}$;

$D_{пред}$ – предельное значение потока, $ч^{-1}$;

K_i – константа ингибирования субстратом, г/л;

K_m – константа насыщения субстрата, г/л;

P – концентрация продукта, г/л;

P_m – максимальная концентрация продукта, г/л;

Q_p – продуктивность, г/(л·ч);

S – концентрация субстрата, г/л;

S_f – концентрация субстрата в поступающем потоке, г/л;

X – концентрация биомассы, г/л;

μ – удельная скорость роста биомассы, $ч^{-1}$;

μ_m – максимальная удельная скорость роста биомассы, $ч^{-1}$;

$Y_{X/S}$ – стехиометрический коэффициент, г/г;

α – константа, г/л;

β – константа, $ч^{-1}$.

ВВЕДЕНИЕ

Процессы микробиологического синтеза являются одними из важнейших при производстве продуктов, находящихся применение в пищевой промышленности, фармацевтике, ветеринарии, сельском хозяйстве и др. Оценка показателей

технологического процесса осуществляется с применением адекватных математических моделей, разработанных с учетом кинетики и способа организации процесса и основанных на результатах экспериментальных исследований. Однако многообразие и специфика процессов микробиологического синтеза затрудняют формирование общего подхода к их моделированию и получению оценок технологических параметров производства. В данной публикации рассмотрен процесс синтеза молочной кислоты как продукта, наиболее широко используемого в мировой практике для целей пищевой, косметической, фармацевтической, текстильной и химической промышленности¹ [1–4].

Молочная кислота производится либо микробной ферментацией, либо химическим синтезом [5, 6]. Нами рассматривается микробная ферментация, при которой используются гомоферментативные и гетероферментативные молочные бактерии¹. Ниже приведено обоснование выбора именно этого процесса, научные разработки которого позволяют наиболее полно, с учетом отдельных особенностей, сформулировать необходимые оценки.

¹Промышленная микробиология: учеб пособие для вузов по специальности «Микробиология» и «Биология» / З. А. Аркадьева, А. М. Безбородов, И. Н. Блохина и др.; под ред. Н. С. Егорова. М.: Высш. шк., 1989. 688 с.

Молочная кислота ($\text{CH}_3\text{CHONCOOH}$) может существовать в виде двух оптических изомеров (рис. 1), отличающихся пространственным расположением атома водорода и спиртового гидроксидов [1]:

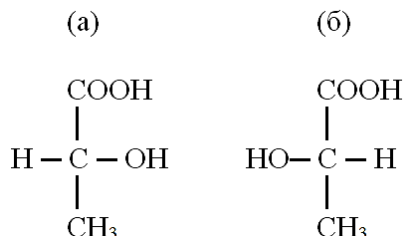


Рис. 1. Изомеры молочной кислоты:
а – D(-)-молочная кислота; б – L(+)-молочная кислота

Fig. 1. Lactic acid isomers:
а – D(-)-lactic acid; б – L(+)-lactic acid

D(-)-молочная кислота не усваивается организмом, а L(+)-молочная кислота усваивается полностью. Это различие в значительной степени определяет заинтересованность получения именно L(+)-молочной кислоты. Поскольку при химическом способе не удается получить чистую L(+)-молочную кислоту, то преимущество в этом случае на стороне ферментативного способа.

Ферментативному способу получения молочной кислоты посвящен довольно большой ряд публикаций. Так, в работе [7] приведен перечень штаммов, продуцирующих молочную кислоту (всего 61 штамм), а также перечень способов ферментации (50 позиций). В обзоре [8] даны кинетические соотношения, учитывающие эффекты ингибирования биомассой, продуктом, субстратом и т.п. при использовании емкостных ферментеров с перемешиванием среды.

Виды используемых математических моделей микробиологического синтеза отличаются друг от друга, при этом количество используемых математических соотношений довольно ограничено [8–10]. При моделировании непрерывного процесса синтеза используются три уравнения баланса – по биомассе, субстрату и продукту соответственно [11–15]:

$$-\mu X + DX = 0; \quad (1)$$

$$D(S_f - S) - \frac{1}{Y_{X/S}} \mu X = 0; \quad (2)$$

$$-DP + (\alpha D + \beta) X = 0, \quad (3)$$

а также уравнение удельной скорости роста биомассы:

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{P}{P_m} \right) \frac{S}{K_m + S + S^2 / K_i}. \quad (4)$$

Из системы (1)–(4) получаем:

$$S_{f1,2} = \frac{B(D)}{2} \left[1 \pm \sqrt{1 - \frac{4K_m K_i}{B^2(D)}} \right] + \frac{Q_P}{Y_{X/S}(\alpha D + \beta)}, \quad (5)$$

$$S_{f1,2} = \frac{B(D)}{2} \left[1 \pm \sqrt{1 - \frac{4K_m K_i}{B^2(D)}} \right] + \frac{Q_P}{Y_{X/S}(\alpha D + \beta)},$$

где

$$B(D) = K_i \left[\frac{\mu_m (DP_m - Q_P)}{P_m D^2} - 1 \right]. \quad (6)$$

Соотношения (5) и (6) формируют две зависимости S_f от D , в которых взаимосвязаны три показателя – S_f , D и Q_P .

В работе [7] приведены константы уравнений, описывающих процесс ферментативного синтеза молочной кислоты (табл. 1). Система уравнений (1)–(6) в совокупности с константами используется для оценки технологических показателей процесса непрерывного синтеза L(+)-молочной кислоты.

Таблица 1. Значения констант

Table 1. Values of constants

Константа	Значение
$\mu_m, \text{ч}^{-1}$	0,48
$P_m, \text{г/л}$	50
$K_m, \text{г/л}$	1,2
$K_i, \text{г/л}$	22
$Y_{X/S}, \text{г/г}$	0,4
$\alpha, \text{г/л}$	2,2
$\beta, \text{ч}^{-1}$	0,2

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Величина протока D ограничена значением, при котором поступающий субстрат вымывается из ферментера, не вступив в процесс синтеза. Это означает, что при использовании равенств (1) и (4) имеем $\mu = D^{\text{пред}}$; $P = 0$; $S = S_f$, т.е.

$$D^{\text{пред}} = \mu_m \frac{K_i S_f}{K_m K_i + K_i S_f + S_f^2}. \quad (7)$$

Таким образом, для любого значения S_f на входе в ферментер значение D не может превышать или быть равным $D^{\text{пред}}$.

Величина продуктивности ограничена максимальным значением $\max Q_P$, которая рассчитывается по соотношению

$$\max Q_P = \frac{\mu_m P_m}{4 \left[2 \left(\frac{K_m}{K_i} \right)^{1/2} + 1 \right]}. \quad (8)$$

Заданная продуктивность процесса Q_P должна быть меньше максимальной:

$$Q_P < \max Q_P. \quad (9)$$

Значения протока и концентрации субстрата на входе в ферментатор, отвечающие максимальной продуктивности, определяются следующими зависимостями:

$$D(\max Q_P) = \frac{\mu_m}{2 \left[2 \left(\frac{K_m}{K_i} \right)^{1/2} + 1 \right]}; \quad (10)$$

$$S_f(\max Q_P) = \frac{0,5 P_m}{Y_{X/S} \left\{ \alpha + \frac{2\beta}{\mu_m} \left[2 \left(\frac{K_m}{K_i} \right)^{1/2} + 1 \right] \right\}} + (K_m K_i)^{1/2}. \quad (11)$$

При заданной продуктивности величина протока ограничена значениями D_1^* и D_2^* :

$$D = D_1^* = \frac{\mu_m}{2 \left[2 \left(\frac{K_m}{K_i} \right)^{1/2} + 1 \right]} \times \left[1 - \sqrt{1 - \frac{4 Q_P}{\mu_m P_m} \left[2 \left(\frac{K_m}{K_i} \right)^{1/2} + 1 \right]} \right]; \quad (12)$$

$$D = D_2^* = \frac{\mu_m}{2 \left[2 \left(\frac{K_m}{K_i} \right)^{1/2} + 1 \right]} \times \left[1 + \sqrt{1 - \frac{4 Q_P}{\mu_m P_m} \left[2 \left(\frac{K_m}{K_i} \right)^{1/2} + 1 \right]} \right], \quad (13)$$

и действительное значение D должно находиться в пределах

$$D_1^* < D < D_2^*. \quad (14)$$

Значение концентрации субстрата в потоках D_1^* и D_2^* можно определить из следующих выражений:

$$S_{f1}(D_1^*) = \frac{B(D_1^*)}{2} \left[1 + \sqrt{1 - \frac{4 K_m K_i}{B^2(D_1^*)}} \right] + \frac{Q_P}{Y_{X/S}(\alpha D_1^* + \beta)}; \quad (15)$$

$$S_{f2}(D_2^*) = \frac{B(D_2^*)}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \frac{4 K_m K_i}{B^2(D_2^*)}} \right] + \frac{Q_P}{Y_{X/S}(\alpha D_2^* + \beta)}. \quad (16)$$

Аналогично тому, как существуют предельные значения протока, отвечающие заданной продуктивности, можно говорить и о предельных концентрациях субстрата, ограничивающих область возможных параметров процесса. С этой целью методом нелинейного программирования (в частности, методом половинного деления) можно найти максимальное значение концентрации субстрата $S_{f1}^{\max}$ и соответствующее ему значение протока $D^{\max}$ путем исследования функции S_f по D :

$$S_f = \frac{B(D)}{2} \left[1 + \sqrt{1 - \frac{4 K_m K_i}{B^2(D)}} \right] + \frac{Q_P}{Y_{X/S}(\alpha D + \beta)}, \quad (17)$$

и минимальные значения $S_{f2}^{\min}$ и $D^{\min}$ путем минимизации функции S_f по D :

$$S_f = \frac{B(D)}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \frac{4 K_m K_i}{B^2(D)}} \right] + \frac{Q_P}{Y_{X/S}(\alpha D + \beta)}. \quad (18)$$

Найденные таким образом значения протоков D_1^* и D_2^* , соответствующие им значения концентрации субстрата $S_{f1}(D_1^*)$ и $S_{f2}(D_2^*)$, а также значения предельных протоков $D^{\max}$ и $D^{\min}$ и соответствующие им значения концентрации субстрата $S_{f1}(D^{\max})$ и $S_{f2}(D^{\min})$ определяют область возможных значений S_f и D , обеспечивающих заданную продуктивность Q_P .

В качестве примера рассмотрим синтез L(+)-молочной кислоты с использованием констант (см. табл. 1).

Максимальная продуктивность по (8): $\max Q_P = 4,09$ г/(л·ч).

Задаем продуктивность процесса с учетом (9): $Q_P = 3,0$ г/(л·ч).

Вычисляем минимальное значение протока по (12): $D_1^* = 0,0791$ ч⁻¹.

Вычисляем концентрацию субстрата в потоке D_1^* по (15): $S_{f1}(D_1^*) = 25,18$ г/л.

Вычисляем максимальное значение протока по (13): $D_2^* = 0,2481$ ч⁻¹.

Вычисляем концентрацию субстрата в потоке D_2^* по выражению (16): $S_{f2}(D_2^*) = 15,175$ г/л.

Методом нелинейного программирования по выражению (15) находим значение максимального протока: $D^{\max} = 0,11$ ч⁻¹, и соответствующую ему концентрацию субстрата:

$$S_{f1}(D^{\max}) = 37,31$$
 г/л.

Методом нелинейного программирования по выражению (16) находим значение минимального протока: $D^{min}=0,22\text{ ч}^{-1}$, и соответствующую ему концентрацию субстрата:

$$S_{f2}(D^{min})=13,51\text{ г/л}.$$

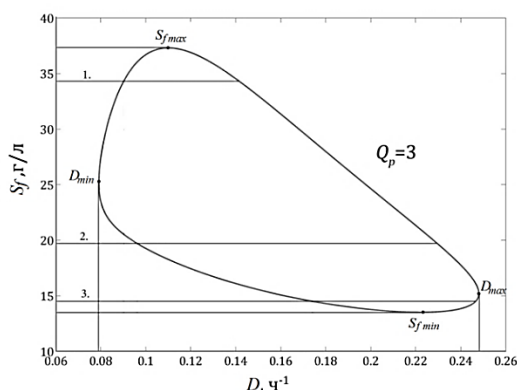


Рис. 2. Портрет области, определяющей значения протока D и концентрации субстрата на входе в ферментатор S_f при заданной продуктивности $Q_p=3,0\text{ г/(л·ч)}$

Fig. 2. Portrait of the area defining the S_f and D values

Полученные данные используем при построении портрета области, определяющей значения S_f и D (см. рис. 2). Характерные точки на портрете в наших обозначениях:

Таблица 2. Расчетные соотношения и результаты расчета стационарных процессов синтеза L(+)-молочной кислоты с продуктивностью $Q_p=3,0\text{ г/(л·ч)}$

Table 2. Comparison of Part I process parameters for $Q_p=3.0\text{ г/(л·ч)}$ and $S_f=34.24\text{ г/л}$

Варьируемая переменная		Расчетное соотношение	Результаты расчета
Диапазон изменений	Принятое значение		
Первый вариант			
$S_{f_1}(D_1^*) < S_f < S_{f_1}^{max}$ (по линии 1)	$S_f = 34,24$ г/л	$S_f \cdot \frac{B(D)}{2} \left[1 + \sqrt{1 - \frac{4K_m K_i}{B^2(D)}} \right] - \frac{Q_P}{Y_{X/S}(\alpha D + \beta)} = 0$	$D_1 = 0,09 \text{ ч}^{-1};$ $D_2 = 0,1424 \text{ ч}^{-1}$
$S_{f_1}(D_2^*) < S_f < S_{f_1}(D_1^*)$ (по линии 2)	$S_f = 19,6$ г/л	$S_f \cdot \frac{B(D)}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \frac{4K_m K_i}{B^2(D)}} \right] - \frac{Q_P}{Y_{X/S}(\alpha D + \beta)} = 0$	$D_1 = 0,10 \text{ ч}^{-1}$
		$S_f \cdot \frac{B(D)}{2} \left[1 + \sqrt{1 - \frac{4K_m K_i}{B^2(D)}} \right] - \frac{Q_P}{Y_{X/S}(\alpha D + \beta)} = 0$	$D_2 = 0,232 \text{ ч}^{-1}$
$S_f^{min} < S_f < S_{f_1}(D_2^*)$ (по линии 3)	$S_f = 14,66$ г/л	$S_f \cdot \frac{B(D)}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \frac{4K_m K_i}{B^2(D)}} \right] - \frac{Q_P}{Y_{X/S}(\alpha D + \beta)} = 0$	$D_1 = 0,17 \text{ ч}^{-1};$ $D_2 = 0,2473 \text{ ч}^{-1}$
Второй вариант			
$D_1^* < D < D_2^*$	$D = 0,15 \text{ ч}^{-1}$	$S_f^1 = \frac{B(D)}{2} \left[1 + \sqrt{1 - \frac{4K_m K_i}{B^2(D)}} \right] + \frac{Q_P}{Y_{X/S}(\alpha D + \beta)}$	$S_f^1 = 22,87$ г/л
		$S_f^2 = \frac{B(D)}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \frac{4K_m K_i}{B^2(D)}} \right] + \frac{Q_P}{Y_{X/S}(\alpha D + \beta)}$	$S_f^2 = 15,90$ $S_f^2 = 15,90$ г/л

$$D_{min} = D_1^*; D_{max} = D_2^*;$$

$$S_{fmax} = S_{f1}(D^{max}); S_{fmin} = S_{f2}(D^{min}).$$

По координатам обозначенных на портрете ограничивающих линий 1, 2, 3, воспроизведенных по уравнениям (5) и (6), в дальнейшем будут рассчитываться показатели S_f и D для технологического процесса (см. рис. 2).

ОЦЕНКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Поскольку все три показателя – S_f , D и Q_p , взаимосвязаны по уравнениям (5) и (6), постановка задачи формулируется в двух вариантах. Для обоих вариантов принятой является величина продуктивности, рассчитанная по уравнению (9).

По первому варианту задается значение концентрации субстрата S_f из области Q_p и определяется значение протока D , обеспечивающего принятую продуктивность.

Для первого варианта область возможных концентраций субстрата S_f делится на три части (на рис. 2 они ограничены горизонтальными линиями 1–3). Такое деление необходимо, так как для каждой части используются свои расчетные соотношения (табл. 2).

В первой части, расположенной выше линии 1, концентрация субстрата меняется в пределах от $S_{f1}(D_1^*)$ до S_{f1}^{max} . Для области, представленной на рис. 2, она составляет от 25,18 до 37,31 г/л. Принятое нами в качестве примера значение концентрации, равное 34,24 г/л, позволило путем решения нелинейного уравнения получить два значения протока – $D_1 = 0,09 \text{ ч}^{-1}$, $D_2 = 0,1424 \text{ ч}^{-1}$, которые обеспечивают заданную продуктивность $Q_P = 3,0 \text{ г/(л·ч)}$ (см. табл. 2). Оба протока соответствуют стационарным режимам протекания процесса, но характеризуются различием значений таких показателей, как концентрация биомассы, X , концентрация субстрата, S , и концентрация молочной кислоты, P , в аппарате (табл. 3).

Решение нелинейных уравнений позволяет определить величину протоков и в двух других диапазонах концентрации субстрата (см. табл. 2). Важно отметить, что в каждом случае получают два значения протока, соответствующих стационарным режимам синтеза молочной кислоты.

Таблица 3. Показатели стационарных процессов синтеза молочной кислоты при концентрации субстрата в питании $S_f=34,21 \text{ г/л}$ и продуктивности $Q_P=3,0 \text{ г/(л·ч)}$

Table 3. Parameters of the stationary process of lactic acid synthesis

Величина протока, $D, \text{ч}^{-1}$	Показатель		
	$X, \text{г/л}$	$S, \text{г/л}$	$P, \text{г/л}$
0,09	7,54	15,39	33,33
0,1424	5,85	19,60	21,13

Значения X , S и P получены путем решения уравнений (1)–(4).

По второму варианту задается значение протока, которое согласно выражению (14) должно находиться в пределах $D_1^* < D < D_2^*$, и вычисляют два значения концентрации субстрата на входе в ферментатор – S_f^1 и S_f^2 (см. табл. 2).

В результате решения уравнений получаем входные координаты двух стационарных процессов синтеза – (D, S_f^1) и (D, S_f^2) .

Для примера величина протока D была выбрана равной $0,15 \text{ ч}^{-1}$. Решение двух нелинейных уравнений (см. табл. 2) позволило определить концентрации субстрата, поступающего в ферментатор, которые обеспечивают стационарные режимы синтеза кислоты при заданной продуктивности – $Q_P = 3,0 \text{ г/(л·ч)}$. В табл. 4 приведены основные показатели этих процессов.

Таблица 4. Показатели стационарных процессов синтеза молочной кислоты при протоке $D = 0,15 \text{ ч}^{-1}$ и продуктивности $Q_P 3,0 \text{ г/(л·ч)}$

Table 4. The parameters of the process when $D=D_{max}$ and $D=D_{min}$

Концентрация субстрата на входе в ферментатор, $S_f, \text{г/л}$	Показатель		
	$S, \text{г/л}$	$X, \text{г/л}$	$P, \text{г/л}$
22,87	15,72	5,66	20,0
15,90	1,75	5,66	20,0

Значения X , S , P получены путем решения уравнений (1)–(4).

Как следует из данных, представленных в табл. 4, при постоянном протоке показатели стационарных режимов отличаются лишь показателем концентрации субстрата в ферментаторе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, представлен подход к оценке стационарных состояний биотехнологических процессов с нелинейной кинетикой биосинтеза, рассмотренный на примере процессов получения молочной кислоты. Кинетика процесса соотносится с использованием штамма микроорганизмов, потребляющего основной субстрат и не воспроизводящего побочных продуктов. Существует множество штаммов, использующих сырье наряду с основным субстратом и воспроизводящих основной субстрат в процессе синтеза, а также образующих в достаточном количестве побочные продукты, которые в отдельных случаях представляют самостоятельную ценность [16–21]. Математические модели таких процессов имеют, конечно же, более сложный характер, однако, мы полагаем, что настоящая методология может быть успешно использована и в этих вариантах.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Смирнов В. А. Пищевые кислоты. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 264 с.
2. Mirasol F. Lactic acid prices falter as competition toughen // Chemical Market Reporter. 1999. Vol. 255, no. 9. P. 16.
3. Datta R., Henry M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2006. Vol. 81, no. 7. P. 1119–1129. <https://doi.org/10.1002/jctb.1486>.
4. Wee Y.-J., Kim J.-N., Ryu H.-W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications // Food Technology and Biotechnology. 2006. Vol. 44, no. 2. P. 163–172.
5. Vijayakumar J., Aravindan R., Viruthagiri T. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid // Chemical and Biochemical Engineering. 2008. Vol. 22, no. 2. P. 245–264.
6. Komesu A., de Oliveira J. A. R., da Silva Martins L. H., Wolf Maciel M. R., Maciel Filho R. Lactic acid production to purification: a review // Biore-sources. 2017. Vol. 12, no. 2. P. 4364–4383. <https://doi.org/10.15376/biores.12.2.Komesu>.
7. Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B. Factors af-

fecting the fermentative lactic acid production from renewable resources // *Enzyme and Microbial Technology*. 2000. Vol. 26, no. 2-4. P. 87–107. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00155-6).

8. Gordeev L. S., Koznov A. V., Skichko A. S., Gordeeva Y. L. Unstructured mathematical models of lactic acid biosynthesis kinetics: a review // *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 2017. Vol. 51, no. 2. P. 175–190. <https://doi.org/10.1134/S0040579517020026>.

9. Bouguettoucha A., Balannec B., Amrane A. Unstructured models for lactic acid fermentation – a review // *Food Technology and Biotechnology*. 2011. Vol. 49, no. 1. P. 3–12.

10. Gordeeva Y. L., Rudakovskaya E. G., Gordeeva E. L., Borodkin A. G. Mathematical modeling of biotechnological process of lactic acid production by batch fermentation: a review // *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 2017. Vol. 51, no. 3. P. 282–298. <https://doi.org/10.1134/S0040579517030058>.

11. Henson M. A., Seborg D. E. Nonlinear control strategies for continuous fermenters // *Chemical Engineering Science*. 1992. Vol. 47, no. 4. P. 821–835. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(92\)80270-M](https://doi.org/10.1016/0009-2509(92)80270-M).

12. Kumar G. P., Subrahmanya S. J. V. K., Chidambaram M. Periodic operation of a bioreactor with input multiplicities // *Canadian Journal of Chemical Engineering*. 1993. Vol. 71, no. 5. P. 766–770. <https://doi.org/10.1002/cjce.5450710515>.

13. Ruan L., Chen X. D. Comparison of several periodic operations of a continuous fermentation process // *Biotechnology Progress*. 1996. Vol. 12, no. 2. P. 286–288. <https://doi.org/10.1021/bp960006l>.

14. Saha P., Patwardhan S. C., Ramahandra R. V. S. Maximizing productivity of a continuous fermenter using nonlinear adaptive optimizing control // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 1999. Vol. 20. P. 15–21. <https://doi.org/10.1007/S004490050553>.

15. Гордеева Ю. Л., Меньшутин Н. В., Гордеева Е. Л., Комиссаров Ю. А. Алгоритм обеспечения реальных условий множественности в

процессах микробиологического синтеза при заданной величине протока // *Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Управление, вычислительная техника, информатика*. 2016. N 2. С. 60–72.

16. Gonzales K., Tebbano S., Lapes F., Thorigne A., Givry S., Dumar D., et al. Modeling the continuous lactic acid production process from wheat flour // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. Vol. 100. P. 147–159. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6949-7>.

17. Vazquez J. A., Murado M. A. Unstructured mathematical model for biomass, lactic acid and bacteriocin production by lactic acid bacteria in batch fermentation // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2008. Vol. 83, no. 1. P. 91–96. <https://doi.org/10.1002/jctb.1789>.

18. Nandasana A. D., Kumar S. Kinetic modeling of lactic acid production from molasses using *Enterococcus faecalis* RKY1 // *Biochemical Engineering Journal*. 2008. Vol. 38, no. 3. P. 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.07.014>.

19. Djukić-Vuković A. P., Mojović L. V., Vukašinović-Sekulić M. S., Nikolić S. B., Pejin J. D. Integrated production of lactic acid and biomass on distillery stillage // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2013. Vol. 36, no. 9. P. 1157–1164. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0842-x>.

20. Flores-Albino B., Arias L., Gómez J., Castillo A., Gimeno M., Shirai K. Chitin and L(+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus* sp. B2 using sugar cane molasses as carbon source // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2012. Vol. 35, no 7. P. 1193–1200. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0706-4>.

21. García-Diéguez C., Salgado J. M., Roca E., Domínguez J. M. Kinetic modelling of the sequential production of lactic acid and xylitol from vine trimming wastes // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2011. Vol. 34, no 7. P. 869–878. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0537-8>.

REFERENCES

1. Smirnov V.A. *Food acids*. Moscow: Legkaya i pishchevaya promyshlennost'; 1983. 264 p. (In Russian).

2. Mirasol F. Lactic acid prices falter as competition toughen. *Chemical Market Reporter*. 1999;255(9):16.

3. Datta R., Henry M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2006;81(7):1119–1129. <https://doi.org/10.1002/jctb.1486>.

4. Wee Y.-J., Kim J.-N., Ryu H.-W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*. 2006;44(2):163–172.

5. Vijayakumar J., Aravindan R., Viruthagiri T. Recent trends in the production, purification and

application of lactic acid. *Chemical and Biochemical Engineering*. 2008;22(2):245–264.

6. Komesu A., de Oliveira J. A. R., da Silva Martins L. H., Wolf Maciel M. R., Maciel Filho R. Lactic acid production to purification: a review. *Biore-sources*. 2017;12(2):4364–4383. <https://doi.org/10.15376/biores.12.2.Komesu>.

7. Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000;26(2-4):87–107. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00155-6).

8. Gordeev L. S., Koznov A. V., Skichko A. S., Gordeeva Y. L. Unstructured mathematical models of lactic acid biosynthesis kinetics: a review. *Theo-*

retical Foundations of Chemical Engineering. 2017; 51(2):175–190. <https://doi.org/10.1134/S0040579517020026>.

9. Bouguettoucha A., Balannec B., Amrane A. Unstructured models for lactic acid fermentation – a review. *Food Technology and Biotechnology*. 2011;49(1):3–12.

10. Gordeeva Y. L., Rudakovskaya E. G., Gordeeva E. L., Borodkin A. G. Mathematical modeling of biotechnological process of lactic acid production by batch fermentation: a review. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 2017;51(3):282–298. <https://doi.org/10.1134/S0040579517030058>.

11. Henson M. A., Seborg D. E. Nonlinear control strategies for continuous fermenters. *Chemical Engineering Science*. 1992;47(4):821–835. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(92\)80270-M](https://doi.org/10.1016/0009-2509(92)80270-M).

12. Kumar G. P., Subrahmanya S. J. V. K., Chidambaram M. Periodic operation of a bioreactor with input multiplicities. *Canadian Journal of Chemical Engineering*. 1993;71(5):766–770. <https://doi.org/10.1002/cjce.5450710515>.

13. Ruan L., Chen X. D. Comparison of several periodic operations of a continuous fermentation process. *Biotechnology Progress*. 1996;12(2):286–288. <https://doi.org/10.1021/bp960006l>.

14. Saha P., Patwardhan S. C., Ramahandra R. V. S. Maximizing productivity of a continuous fermenter using nonlinear adaptive optimizing control. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 1999;20:15–21. <https://doi.org/10.1007/S004490050553>.

15. Gordeeva Y. L., Menshutina N. V., Gordeeva E. L., Komissarov Y. A. Algorithms ensuring the real conditions of multiplicity in the microbiological synthesis processes at the given dilution rate. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya: Upravlenie, vychislitel'naya tekhnika, informatika = Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Management,*

Computer Sciences and Informatics. 2016;2:60–72. (In Russian).

16. Gonzales K., Tebbano S., Lapes F., Thorigne A., Givry S., Dumar D., et al. Modeling the continuous lactic acid production process from wheat flour // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. Vol. 100. P. 147–159. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6949-7>.

17. Vazquez J. A., Murado M. A. Unstructured mathematical model for biomass, lactic acid and bacteriocin production by lactic acid bacteria in batch fermentation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2008;83(1):91–96. <https://doi.org/10.1002/jctb.1789>.

18. Nandasana A. D., Kumar S. Kinetic modeling of lactic acid production from molasses using *Enterococcus faecalis* RKY1. *Biochemical Engineering Journal*. 2008;38(3):277–284. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.07.014>.

19. Djukić-Vuković A. P., Mojović L. V., Vukašinović-Sekulić M. S., Nikolić S. B., Pejin J. D. Integrated production of lactic acid and biomass on distillery stillage. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2013;36(9):1157–1164. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0842-x>.

20. Flores-Albino B., Arias L., Gómez J., Castillo A., Gimeno M., Shirai K. Chitin and L(+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus* sp. B2 using sugar cane molasses as carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2012;35(7):1193–1200. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0706-4>.

21. García-Diéguez C., Salgado J. M., Roca E., Domínguez J. M. Kinetic modelling of the sequential production of lactic acid and xylitol from vine trimming wastes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2011;34(7):869–878. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0537-8>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ю. Л. Гордеева,

к.т.н., доцент, заведующая кафедрой информационных технологий, математики и физики, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К. И. Скрябина, 109472, г. Москва, ул. Акад. Скрябина, 23, Российская Федерация, gordulia32@gmail.com <https://orcid.org/0000-0002-3059-794X>

Б. А. Ульянов,

д.т.н., профессор, Ангарский государственный технический университет, 665835, г. Ангарск, ул. Чайковского, 60, Российская Федерация,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yuliya L. Gordeeva,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor, Head of the Department of Information Technologies, Mathematics and Physics, Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K. I. Skryabin, 23, Akademik Skryabin St., Moscow, 109472, Russian Federation, gordulia32@gmail.com <https://orcid.org/0000-0002-3059-794X>

Boris A. Ul'yanov,

Dr. Sci. (Engineering), Professor, Angarsk State Technical University, 60, Tchaikovsky St., Angarsk, 665835, Russian Federation, ulyanovba@mail.ru

ulyanovba@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3025-0743>

<https://orcid.org/0000-0002-3025-0743>

Е. Л. Гордеева,
к.т.н., доцент,
Российский химико-технологический
университет им. Д. И. Менделеева,
125047, г. Москва, Миусская пл., 9,
Российская Федерация,
Elena.Gordeeva311@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1036-2887>

Elena L. Gordeeva,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Mendeleev University of Chemical Technology,
9, Miusskaya Sq., Moscow, 125047,
Russian Federation,
Elena.Gordeeva311@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1036-2887>

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.*

Информация о статье

*Поступила в редакцию 11.07.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.*

Information about the article

*The article was submitted 11.07.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.*

Научная статья
УДК 577.22:577.23

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-570-580>



Митохондриальный комплекс этиолированных побегов гороха

Ирина Владимировна Уколова*, Илья Геннадьевич Кондратов**,
Марина Александровна Кондакова*, Ирина Викторовна Любушкина*****,
Ольга Ивановна Грабельных*****, Геннадий Борисович Боровский*

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,

г. Иркутск, Российская Федерация

**Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека,

г. Иркутск, Российская Федерация

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

Автор, ответственный за переписку: Уколова Ирина Владимировна, irinastupnikova@mail.ru

Аннотация. Изучение митохондриальных комплексов в различных организмах дает представление о нативной организации белков и метаболических путей в органеллах конкретного изучаемого объекта. Понятие «комплексом» появилось относительно недавно и характеризует протеом белковых комплексов, суперкомплексов и олигомерных белков. Анализ комплекса проводится с помощью современных электрофоретических и масс-спектрометрических методов, в частности, путем двумерного электрофореза (2D BN/SDS-PAGE) в сочетании с масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS). Данный подход расширяет возможности изучения протеома органелл, поскольку, в отличие от двумерного 2D IEF/SDS-PAGE, позволяет анализировать не только гидрофильные белки матрикса митохондрий, но и мембранные белки и их ассоциации. В настоящей работе впервые при помощи 2D BN/SDS-PAGE с последующей MALDI-TOF MS был изучен комплекс этиолированных побегов гороха. С этой целью было проанализировано 145 белковых пятен, вырезанных из геля, и идентифицировано 110 полипептидов, которые отнесены к различным функциональным группам. Денситометрический анализ показал, что мажорной группой белков являются ферменты энергетической системы митохондрий (1), на долю которых приходится в среднем 43% содержания всех полипептидов. Остальные 57% главным образом распределены между следующими функциональными категориями: пируватдегидрогеназный комплекс и цикл трикарбоновых кислот (2); аминокислотный метаболизм (3); процессинг нуклеиновых кислот (4); фолдинг белка (5); антиоксидантная защита (6); белки-транспортёры (7); другие белки (8); белки с неизвестными функциями (9). Полученные данные указывают на комплексную организацию протеома гороха. Обнаружено, что не только ферменты системы ОКСФОС формируют надмолекулярные структуры, но и белки других функциональных категорий. Предполагается, что присутствие белков других компартментов клетки может свидетельствовать о взаимодействии митохондрий с ферментами или структурами соответствующих органелл. В целом полученные данные по комплексу гороха представляют собой своеобразный «паспорт» митохондрий, в котором отражено нативное состояние протеома органелл, соответствующее их физиологическому статусу.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., митохондрии, протеом, комплексом, BN-PAGE

Благодарности. В работе использовано оборудование Центров коллективного пользования «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН и «Ультрамикроанализ» Лимнологического института СО РАН (г. Иркутск).

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-04-01233а.

Для цитирования: Уколова И. В., Кондратов И. Г., Кондакова М. А., Любушкина И. В., Грабельных О. И., Боровский Г. Б. Митохондриальный комплекс этиолированных побегов гороха // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 570–580. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-570-580>.

Mitochondrial complexome of etiolated pea shoots

Irina V. Ukolova*, Ilya G. Kondratov**, Marina A. Kondakova*,
Irina V. Lyubushkina****, Olga I. Grabelnykh****, Gennadii B. Borovskii*

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS,
Irkutsk, Russian Federation

**Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems,
Irkutsk, Russian Federation

***Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

Corresponding author: Irina V. Ukolova, irinastupnikova@mail.ru

Abstract. Studies into mitochondrial complexomes in various organisms provide an insight into the native organization of proteins and metabolic pathways in the organelles of the subject under study. "Complexome" is a relatively recent concept describing the proteome of protein complexes, supercomplexes, and oligomeric proteins. Complexome analysis is performed using current electrophoretic and mass spectrometric techniques, in particular, by two-dimensional electrophoresis (2D BN/SDS-PAGE) in combination with mass spectrometry (MS). Unlike 2D IEF/SDS-PAGE, this method enables analysis of not only hydrophilic proteins of the mitochondrial matrix, but also membrane proteins and their associations, thus expanding the possibilities of studying the organelle proteome. In the present work, the complexome of etiolated pea shoots was studied for the first time using 2D BN/SDS-PAGE followed by MALDI-TOF MS. To this end, 145 protein spots excised from the gel were analyzed; 110 polypeptides were identified and assigned to different functional groups. A densitometric analysis revealed that the major protein group comprised the enzymes of the mitochondrial energy system (1), accounting for an average of 43% of the total polypeptide content. The remaining 57% was primarily distributed among the following functional categories: pyruvate dehydrogenase complex and citric acid cycle (2); amino acid metabolism (3); nucleic acid processing (4); protein folding (5); antioxidant protection (6); carrier proteins (7); other proteins (8); proteins having unknown functions (9). The obtained data indicate the complex organization of the pea proteome. In addition to the enzymes of the OXPHOS system, the proteins of other functional categories are found to form supramolecular structures. It is suggested that the presence of proteins from other cellular compartments may indicate the interaction of mitochondria with the enzymes or structures of corresponding organelles. In general, the obtained data on the pea complexome represent a kind of a mitochondrial "passport" that reflects the native state of the proteome of organelles corresponding to their physiological status.

Keywords: *Pisum sativum* L., mitochondria, proteome, complexome, BN-PAGE

Acknowledgment. The study was carried out using the equipment of the Centers for Collective Use "Bioanalitika" (Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the SB RAS) and "Ultramikroanaliz" (Limnological Institute of the SB RAS).

Funding. The work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 14-04-01233a).

For citation: Ukolova I. V., Kondratov I. G., Kondakova M. A., Lyubushkina I. V., Grabelnykh O. I., Borovskii G. B. Mitochondrial complexome of etiolated pea shoots. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):570-580. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-570-580>.

ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии являются жизненно важными органеллами клетки, основной функцией которых является производство энергии в виде аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) для поддержания всех процессов жизнедеятельности. Однако помимо энергетической эти органеллы выполняют ряд дополнительных, не менее ценных функций, таких как биосинтез аминокислот, нуклеотидов, витаминов и кофакторов, экспорт интермедиатов цикла Кребса для различных клеточных биосинтетических процессов, сигналинг и участие в поддержании редокс-баланса в клет-

ке, инициация апоптоза и другие [1, 2].

Такое многообразие функций требует сложной организованной работы и вовлечения огромного количества ферментов и других белков. Исследования митохондриальных протеомов различных видов позволили идентифицировать значительное количество белков в органеллах изучаемых объектов. Так, в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* был выявлен 901 митохондриальный белок [3], что по предварительным подсчетам составляет более 90% протеома митохондрий этого вида. В соответствующих органеллах млекопитающих удалось идентифицировать 1098

различных продуктов генов [4]. Предполагается, что растительные митохондрии могут содержать от 2000 до 3000 различных белков, что значительно превышает их количество в других изученных организмах [1]. Это неудивительно, поскольку, как известно, митохондрии растений имеют дополнительные белки и функции, многие из которых имеют отношение к фотодыханию [5].

Современные протеомные методы исследования, использующие одно- и двумерный электрофорезы на основе BN-PAGE (1D BN и 2D BN/SDS-PAGE) в сочетании с масс-спектрометрией (MALDI-TOF, LC-MS/MS), позволяют не только идентифицировать состав белков в различных компартментах клетки, но и определять олигомерное состояние полипептидов, а также выявлять комплексы и ассоциации, в которые они вовлечены. Так, протеомное исследование митохондриального комплекса *Arabidopsis thaliana* позволило идентифицировать 1359 различных белков и обнаружило большое количество потенциальных белок-белковых взаимодействий и новых ассоциаций [6]. Для систематизации полученных данных и аннотации белков согласно функциональным категориям была разработана программная платформа GelMap [7], которая на данный момент содержит данные по комплексам митохондрий *A. thaliana*, *Medicago truncatula*, *Viscum album* и протеомам *Oryza sativa* и *Cyclamen persicum*. Комплексом гороха пока не изучался в связи с отсутствием полной аннотации генома. Тем не менее, используя 2D BN-PAGE в сочетании с MS и идентификацией белков через поиск гомологичных последовательностей в базе данных NCBI, мы предприняли попытку изучить состав и белок-белковые взаимодействия в протеоме митохондрий этого вида. В результате исследований нам удалось идентифицировать 110 полипептидов, относящихся к разным функциональным категориям, и изучить их нативное состояние, что позволило приблизиться к пониманию организации комплекса митохондрий гороха и предположить взаимодействие этих оргanelл с другими компартментами клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали этилированные побеги 6-суточных проростков гороха (*Pisum sativum* L., сорт Аксайский усатый 55), выращенных на влажной фильтровальной бумаге при 20 °C. Этилированные побеги являются удобным объектом для исследования, поскольку их использование позволяет, во-первых, довольно быстро получить нужный объем материала для выделения митохондрий; во-вторых, избежать минорных загрязнений хлоропластами (что бывает при работе с зелеными растениями); в-третьих, получить фракцию митохондрий, свободных от функциональных (и, возможно, структурных) взаимодействий с хлоропластами *in vivo*.

Выделение и очистку митохондрий проводили по методике, описанной ранее [8]. Митохондрии солюбилизировали при помощи дигитонина согласно протоколу S. Sunderhaus с соавторами [9]. Соотношение белка и детергента составляло 1:5. Разделение солюбилизированных белков и их ассоциаций проводили при помощи 2D BNE/SDS-PAGE [10]. Для разделения в первом направлении (1D BN-PAGE) использовали полиакриламидный градиентный гель 3,5–16%, для второго денатурирующего направления (SDS-PAGE) – 10%-й полиакриламидный гель. Анализ молекулярных масс проводили при помощи Bio-Rad Image Lab software (version 5.2.1) [8]. Пятна, вырезанные из гелей, анализировали с помощью матричной лазерной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) [8]. Идентификацию полученных масс-спектров проводили с использованием базы данных NCBI с таксономическим ограничением до *Viridiplantae* (зеленые растения).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

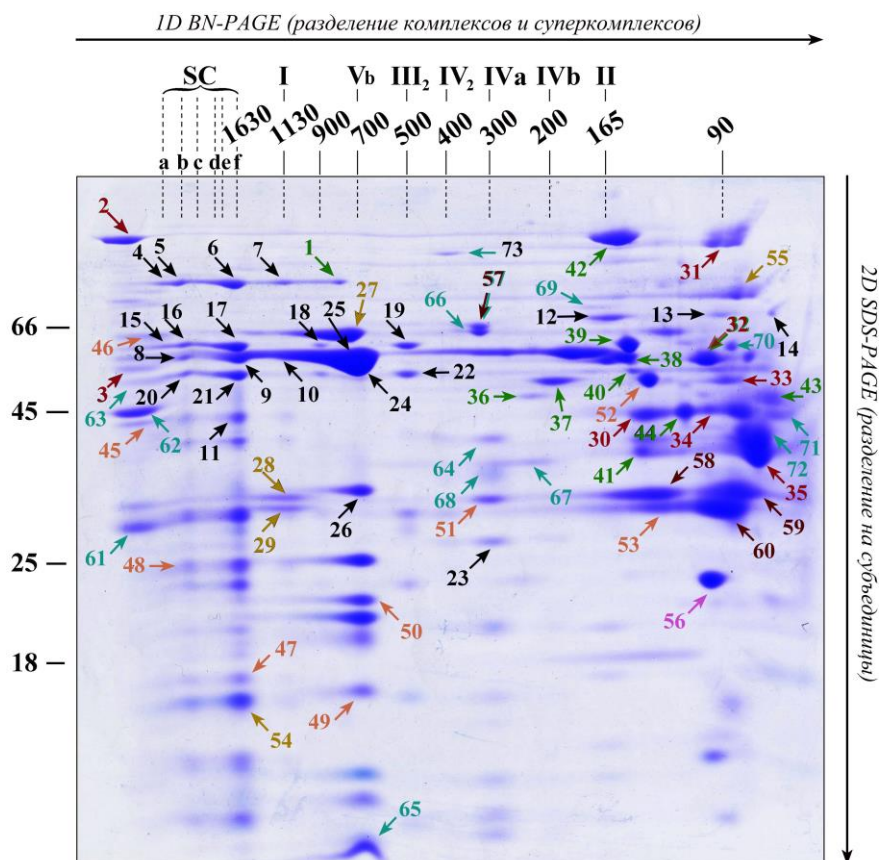
В данной работе комплексом митохондрий гороха был впервые изучен при помощи двумерного электрофореза (2D BN/SDS-PAGE), при котором разделение образцов в первом направлении проводили при помощи нативного голубого электрофореза 1D BN-PAGE, а во втором направлении – в денатурирующих условиях SDS-PAGE. На рисунке представлен референсный гель. Комплексы и суперкомплексы системы окислительного фосфорилирования (ОКФОС), а также их массы указаны сверху над гелем. Sca-f – суперкомплексы, имеющие состав $I_{1-2}III_{2-4}IV_{0-n}$, описаны нами ранее [8]. Слева даны массы молекулярных маркеров (кДа) для второго денатурирующего направления (SDS-PAGE). Номера пятен обозначены различными цветами для выделения функциональных категорий. Идентификация пятен приведена в таблице.

Ранее N. L. Taylor с соавторами [11], используя классический 2D IEF/SDS-PAGE с изоэлектрофокусированием нативных белков в первом направлении, уже предпринимали попытку изучения протеома митохондрий зеленых растений гороха. Авторам удалось идентифицировать 33 полипептида, из которых всего лишь 8 имели мембранную локализацию и представляли собой субъединицы АТФ-синтазы и комплекса I дыхательной цепи. Применяемый в нашей работе метод 2D BN/SDS-PAGE расширяет возможности изучения протеома, поскольку позволяет идентифицировать существенно больше мембранных белков, а также анализировать нативные белковые комплексы и их ассоциации [5].

При помощи масс-спектрометрии с последующим поиском гомологичных последовательностей в базе данных NCBI было проанализировано 145 белковых пятен, вырезанных из 2D BN/SDS-геля. Нам удалось идентифицировать

110 полипептидов, большая часть которых обнаружила гомологию с имеющимися немногочисленными аннотированными митохондриальными белками гороха (*Pisum sativum* L.) и с белками родственных видов семейства бобовые (Fabaceae). В таблице приведены основные идентифицированные белки, которые распределены по следующим функциональным категориям: фер-

менты системы окислительного фосфорилирования (ОКСФОС) (1); пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК) и цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) (2); метаболизм аминокислот (3); процессинг нуклеиновых кислот (4); фолдинг и процессинг белков (5); антиоксидантная защита (6); транспортные белки (7); другие белки (8); белки с неизвестными функциями (9).



Идентифицированные субъединицы митохондриального комплекса
этиолированных побегов гороха на 2D BN/SDS-геле

Identified subunits of mitochondrial complexome
of etiolated pea shoots on 2D BN/SDS-gel

Идентифицированные белки митохондриального комплекса *Pisum sativum* L.

Identified proteins of mitochondrial complexome of *Pisum sativum* L.

N	Название субъединицы	Идентиф. номер	Вид растения	N	Название субъединицы	Идентиф. номер	Вид растения
(1) Ферменты системы ОКСФОС				(3) Метаболизм аминокислот			
Комплекс I				1	3-methylcrotonyl CoA carboxylase	gil21355055	<i>Pisum sativum</i>
4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 1	XP_003600690.1	<i>Medicago truncatula</i>	36	NADP-specific glutamate dehydrogenase	gil922345161	<i>Medicago truncatula</i>
5	NADH DH [ubiquinone] iron-sulfur protein 1	gil694389863	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	37	Alanine-glyoxylate aminotransferase-like protein	gil357519613	<i>Medicago truncatula</i>
6	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	gil357460817	<i>Medicago truncatula</i>	38	Serine transhydroxymethyl-transferase	gil357490157	<i>Medicago truncatula</i>
7	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	gil357460817	<i>Medicago truncatula</i>	39	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	gil357477461	<i>Medicago truncatula</i>
8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1	gil356533373	<i>Glycine max</i>	40	Ornithine aminotransferase	gil167047943	<i>Pisum sativum</i>
9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1	XP_010682836.1	<i>Beta vulgaris</i>	41	Arginase 1, mitochondrial	gil502146607	<i>Cicer arietinum</i>

Продолжение таблицы

10	NADH dehydrogenase	PNY13885.1	<i>Trifolium pratense</i>	42	Glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial	gi 121083	<i>Pisum sativum</i>
11	NADH dehydrogenase subunit 7	gi 817530547	<i>Geranium maderense</i>	32	Dihydrolipoamide dehydrogenase, glycine cleavage system L protein	gi 9955321	<i>Pisum sativum</i>
Комплекс II				43	Aminomethyltransferase, glycine cleavage system T protein	gi 3915699	<i>Pisum sativum</i>
12	Succinate DH [ubiquinone] flavoprotein subunit 1	gi 922358972	<i>Medicago truncatula</i>	44	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	gi 5869965	<i>Pisum sativum</i>
13	Succinate DH [ubiquinone] flavoprotein subunit 1	gi 922358972	<i>Medicago truncatula</i>	(4) Процессинг нуклеиновых кислот			
14	Succinate DH [ubiquinone] flavoprotein subunit 1	gi 922358972	<i>Medicago truncatula</i>	45	60S ribosomal L7-1-like protein (cytoplasmic)	gi 728835712	<i>Gossypium arboreum</i>
Комплекс III				46	Arginine-tRNA ligase, cytoplasmic-like	gi 356520826	<i>Glycine max</i>
15	Probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta, mitochondrial	XP_013448517.1	<i>Medicago truncatula</i>	47	Pentatricopeptide repeat-containing protein	gi 475505056	<i>Aegilops tauschii</i>
16	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	gi 502103363	<i>Cicer arietinum</i>	48	Maturase R, partial (mitochondrion)	gi 507118298	<i>Voyria rosea</i>
17	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	gi 502103363	<i>Cicer arietinum</i>	49	Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g80150, mitochondrial	gi 357148282	<i>Brachypodium distachyon</i>
18	Probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta	XP_004492264.1	<i>Cicer arietinum</i>	50	Pentatricopeptide repeat-containing protein At4g35850, mitochondrial-like	gi 743942490	<i>Populus euphratica</i>
19	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	gi 502103363	<i>Cicer arietinum</i>	50	Ribosomal protein S11 (mitochondrion)	gi 918020301	<i>Botryococcus braunii</i>
20	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-like	gi 502138725	<i>Cicer arietinum</i>	51	Pentatricopeptide repeat-containing protein At5g16420, mitochondrial	gi 645252616	<i>Prunus mume</i>
21	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-like	gi 502138725	<i>Cicer arietinum</i>	52	Pentatricopeptide repeat-containing protein At2g20540-like	gi 702488820	<i>Eucalyptus grandis</i>
22	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-like	gi 502138725	<i>Cicer arietinum</i>	53	Maturase K, partial (chloroplast)	gi 304281783	<i>Erica scoparia</i>
Комплекс IV				(5) Фолдинг и процессинг белков			
23	Cytochrome c oxidase subunit 2	gi 429465284	<i>Gossypium hirsutum</i>	27	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	gi 357442731	<i>Medicago truncatula</i>
Комплекс V				28	Prohibitin-1, mitochondrial	gi 697107722	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>
24	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	gi 543866	<i>Pisum sativum</i>	29	Prohibitin complex protein	gi 922374536	<i>Medicago truncatula</i>
25	F ₀ F ₁ -type ATP synthase, beta subunit	gi 922396606	<i>Medicago truncatula</i>	54	Methionine aminopeptidase 1A	gi 734410675	<i>Glycine soja</i>
26	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	gi 734364680	<i>Glycine soja</i>	55	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	gi 585272	<i>Pisum sativum</i>
(2) Пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК) и цикл трикарбоновых кислот (ЦТК)				(6) Антиоксидантная защита			
2	E1 subunit-like 2-oxoglutarate DH	gi 922339111	<i>Medicago truncatula</i>	56	Superoxide dismutase	gi 20902	<i>Pisum sativum</i>
3	Pyruvate DH complex dihydrolipoamide acetyltransferase, long form	gi 357513835	<i>Medicago truncatula</i>	(7) Транспортные белки			
30	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, mitochondrial	gi 1709449	<i>Pisum sativum</i>	57	Succinate/fumarate mitochondrial transporter, putative	gi 255540015	<i>Ricinus communis</i>
31	Aconitate hydratase 2, mitochondrial-like	gi 727556496	<i>Camelina sativa</i>	58	Voltage-dependent anion-selective channel protein; (VDAC)	gi 1172558	<i>Pisum sativum</i>
32	Pyruvate dehydrogenase complex E3 subunit	gi 14916975	<i>Pisum sativum</i>	59	Voltage-dependent anion-selective channel protein; (VDAC)	gi 1172558	<i>Pisum sativum</i>
33	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	gi 828292831	<i>Cicer arietinum</i>	60	ADP, ATP carrier protein 1, mitochondrial-like	gi 502165914	<i>Cicer arietinum</i>
33	Citrate synthase	gi 922391447	<i>Medicago truncatula</i>	60	ADP, ATP carrier protein 2, mitochondrial-like	gi 727487813	<i>Camelina sativa</i>
34	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	gi 922402629	<i>Medicago truncatula</i>	60	ADP, ATP carrier protein 3, mitochondrial-like	gi 356549910	<i>Glycine max</i>
35	Malate dehydrogenase	gi 922335062	<i>Medicago truncatula</i>	60	Dicarboxylate carrier protein	gi 357518913	<i>Medicago truncatula</i>
(8) Другие белки				(8) Другие белки			
61	Probable methyltransferase PMT26	gi 951065652	<i>Vigna radiata</i>	67	Probable lactoylglutathione lyase, chloroplast	gi 685335794	<i>Brassica rapa</i>
62	Phosphoglycerate mutase-like protein	gi 545369426	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	68	Polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase	gi 848885083	<i>Brassica rapa</i>

Окончание таблицы

63	S-adenosylmethionine synthetase, partial	gi 403327789	<i>Populus nigra</i>	69	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase-like protein Chain A, crystal structure of aminoaldehyde dehydrogenase 1	gi 357482107	<i>Medicago truncatula</i>
64	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 3, chloroplastic-like Probable GTP-binding protein OBG, mitochondrial isoform X2	gi 727459326	<i>Camelina sativa</i>	70		gi 284055632	<i>Pisum sativum</i>
65	NAD-dependent malic enzyme 59 kDa isoform, mitochondrial	gi 731337481	<i>Beta vulgaris</i>	71	Iron-sulfur cluster assembly protein 1-like	gi 720083993	<i>Nelumbo nucifera</i>
66	NADP-dependent malic enzyme	gi 734322701	<i>Glycine soja</i>	72	Iron-sulfur cluster assembly protein 1-like	gi 848860786	<i>Erythranthe guttata</i>
57		gi 357513073	<i>Medicago truncatula</i>	73	Lipoxygenase LOXN3	gi 219935421	<i>Pisum sativum</i>

Примечание. Названия основных идентифицированных белков и идентификационные номера приведены в соответствии с их аннотацией в базе данных NCBI; данные по полипептидам с неизвестными функциями не приведены; N – номер пятна на геле; вид – вид растения, белок которого показал наибольшую степень сходства аминокислотной последовательности (наибольшее количество совпавших масс пептидов) с изучаемым белком гороха. В ряде случаев некоторые белки имеют одинаковые идентификационные номера, поскольку выявлены в одном пятне.

Денситометрический анализ 2D BN/SDS-гелей показал, что в среднем 43% содержания всех полипептидов составляют ферменты системы ОКСФОС (1). Это неудивительно, поскольку ферменты фосфорилирующей системы митохондрий играют ключевую роль в обеспечении всех клеточных процессов энергией и занимают основной объем внутренней митохондриальной мембраны [12]. Нам удалось идентифицировать субъединицы всех комплексов дыхательной цепи и 3 субъединицы АТФ-синтазы (см. таблицу). Основная часть обнаруженных субъединиц комплексов I и III находится в составе высокомолекулярных дыхательных суперкомплексов S_{Ca}-f (см. рисунок) [8]. В отличие от этих ферментов большая часть популяции дыхательных комплексов II и IV, а также комплекс V сольбилизируются в основном в свободном, не связанном с другими комплексами, виде.

Анализ расположения других идентифицированных белков показал, что не только ферменты системы ОКСФОС, но и компоненты других функциональных групп могут формировать ассоциации. Так, детекция субъединиц оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (ОГДК, пятно (далее п) 2), имеющего нативную массу 3,5 МДа, а также пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК, п3), имеющего массу около 10 МДа, в одной высокомолекулярной области в первом нативном направлении (1D), может указывать на ассоциацию этих комплексов с другими белками (см. рисунок). Остальные идентифицированные ферменты цикла Кребса (2) (п32–35) локализуются в низкомолекулярной области в первом направлении и, судя по молекулярным массам, сольбилизируются в виде гомодимеров. Исключением является аконитаза (п31), которая присутствует в виде мономера, поскольку не имеет четвертичной структуры.

Имеются данные, указывающие на ассоциацию некоторых ферментов цикла Кребса с внутренней мембраной митохондрий [13]. Кроме того, есть основания полагать, что все ферменты ЦТК

взаимодействуют не только функционально, но и физически, формируя метаболон ЦТК [14]. Таким образом, метаболон ЦТК, по-видимому, представляет собой сложный полиферментный комплекс, определенные компоненты которого физически взаимодействуют с внутренней митохондриальной мембраной. Учитывая тот факт, что субъединицы ОГДК (п2) и ПДК (п3) формируют высокомолекулярные ассоциации, мы предполагаем, что метаболон цикла Кребса может связываться с внутренней мембраной митохондрий через два высокомолекулярных комплекса – ПДК и ОГДК.

Ферменты аминокислотного метаболизма (3) в основном сольбилизируются в своей наиболее стабильной олигомерной форме (см. рисунок). Так, например, фермент метилкротонил-КоА-карбоксилаза (п1), участвующий в катаболизме лейцина, мигрирует в области 780 кДа в первом направлении (1D BNE), что соответствует массе очищенного фермента [15]. В то же время 1-пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназа (п39), участвующая в деградации L-пролина до L-глутамата, сольбилизируется в виде димера, хотя в нативном состоянии представляет собой гексамер, состоящий из трех димеров [16]. Видимо, димерная форма для этого фермента, а также и для серингидроксиметилтрансферазы (п38), орнитинаминотрансферазы (п40), дигидролипоилдегидрогеназы (п32) и изовалерил-КоА-дегидрогеназы (п44) является наиболее устойчивой к действию детергента, несмотря на то что *in vivo* ферменты имеют тетрамерную (п38, 44), состоящую из 2-х димеров, или гексамерную (п32, 44), состоящую из 3-х димеров, структуры.

Практически все идентифицированные белки, осуществляющие процессинг нуклеиновых кислот (4), обнаружены в составе пока еще неизученных комплексов. Так, пять обнаруженных PPR-белков, то есть белков, содержащих пентатрикопептидные повторы (PPR), входят в состав нескольких комплексов с массами 135 (п52), 300 (п51), 700 (п49, п50) и 1630 кДа (п47) (см.

рисунок). Подобные комплексы были выявлены также в митохондриях *A. thaliana* [6]. Предполагается участие этих белков в посттранскрипционных процессах в растительных органеллах, что может требовать присутствия дополнительных факторов, которые, вероятно, и являются частью подобных комплексов. Помимо PPR-белков матураза R (п48), которая вовлечена в сплайсинг митохондриальных транскриптов *nad1* и других генов, также, по-видимому, присутствует в составе пока неизвестного высокомолекулярного комплекса с массой, существенно превышающей 1630 кДа (см. рисунок). Очевидно, этот фермент вместе с другими матуразами и факторами сплайсинга может входить в состав митохондриального сплайсингового комплекса, также называемого прото-сплайсосомой [17]. Обращает на себя внимание присутствие минорных количеств цитоплазматических 60S рибосомного L7-1-подобного белка (п45) и аргинин-тРНК-лигазы (п46) в области более 3 МДа. Эти белки могут являться компонентами цитоплазматической трансляционной мультиферментной машины. Мы предполагаем, что присутствие этих белков не является простым загрязнением, а скорее всего указывает на взаимодействие митохондрий с мембранами эндоплазматического ретикулума, как это уже отмечалось в ряде исследований (рассмотрено подробно в обзорной статье [18]).

Хорошо изученный митохондриальный шаперонин БТШ60 (п27), который относится к группе белков, осуществляющих *фолдинг и процессинг полипептидов* (5), идентифицирован в области 750 кДа в первом направлении BN (см. рисунок). Это указывает на то, что комплекс БТШ60 сольбилизируется в нативной олигомерной форме, которая отличается высокой устойчивостью к действию дигитонина [8]. Идентифицированные митохондриальные прохибитины также формируют высокомолекулярные комплексы с массой около 1130 кДа (п28, 29). Подобные прохибитиновые комплексы были обнаружены в митохондриях *M. truncatula* [5] и *A. thaliana* (<https://gelmap.de/1227>). Функции этих белков пока до конца неясны, но имеются данные, указывающие на их шаперонную активность, а также важную роль в развитии устойчивости к различным стрессовым воздействиям [5]. БТШ70 (п55) не обнаружен в составе ассоциаций в изучаемых органеллах.

Из ферментов *антиоксидантной защиты* (6) удалось идентифицировать только митохондриальную марганцевую супероксиддисмутазу (п56). Фермент имеет матриксную локализацию и сольбилизовался дигитонином в своей нативной функциональной тетрамерной форме (см. рисунок).

Из большого семейства *митохондриальных транспортных белков* (7) удалось идентифицировать порины (п58, п59), которые являются самыми распространенными белками внешней митохондриальной мембраны, и АДФ/АТФ-тран-

сложазы (п60), одни из самых распространенных белков внутренней мембраны (см. рисунок). В нашем исследовании олигомеры порина были обнаружены в виде диффузных пятен в области 80–90 и 130–150 кДа, что согласуется с данными других исследователей, которые дополнительно детектировали олигомеры VDAC с большей молекулярной массой [19, 20]. Три изоформы АДФ/АТФ-транслокатора и переносчик дикарбоксилатов локализуются в одном пятне (п60) в области 90 кДа, что может предполагать олигомерное состояние этих белков. Действительно, до недавнего времени считалось, что как АДФ/АТФ-транслокатор [21], так и дикарбоксилатный переносчик [22] являются гомодимерами. Однако на сегодняшний день некоторые ученые оспаривают эти данные и доказывают, что АДФ/АТФ-транслокатор и все представители семейства переносчиков внутренней митохондриальной мембраны функционируют в мономерной форме [23]. Дальнейшие исследования организации и механизмов работы этих переносчиков помогут прояснить этот спорный вопрос.

В группе *других белков* (8) представлено 14 полипептидов, 7 из которых имеют митохондриальную локализацию и участвуют в процессах сигнальной трансдукции (п65), метаболизме пировата (п57, 66), сборке железо-серных кластеров (п71, 72), деградации альдегидов (п70) и окислении полиненасыщенных жирных кислот (п73). Большинство из них имеют либо олигомерную форму, либо находятся в ассоциациях с другими белками митохондрий (см. рисунок). Остальные полипептиды, присутствующие в геле в основном в небольших количествах, локализованы в цитоплазме (п62, 63), этиопластах (п64, 67), аппарате Гольджи (п61, 68) и пероксисомах (п69). Мы предполагаем, что наличие этих белков во фракции изучаемых митохондрий может свидетельствовать не о простом ее загрязнении, а о взаимодействии органелл с другими компартментами клетки. Это предположение подкрепляется имеющимися литературными данными о взаимодействии некоторых компартментов клетки с митохондриями. Так, например, авторами работы [24] было обнаружено, что ферменты гликолиза, имеющие цитоплазматическую локализацию, могут ассоциировать с внешней мембраной растительных митохондрий, по-видимому, через белок VDAC. Также известно, что существуют контактные сайты между наружной мембраной митохондрий и мембранами эндоплазматического ретикулума [18]. Как следует из высокомолекулярной нативной массы белков других компартментов клетки (направление 1D BN-PAGE), идентифицированных в нашем исследовании, эти полипептиды сольбилизируются либо в олигомерной форме, либо в ансамбле с другими белками (см. рисунок). Так, например, фосфоглицератмутаза (п62), катализирующая 8-ую ре-

акцию гликолиза, идентифицирована в высокомолекулярной области с массой более 3 МДа, что предполагает ее ассоциацию с другими полипептидами. Учитывая имеющиеся литературные данные [24], мы полагаем, что высокомолекулярный комплекс, включающий фосфоглицератмутаза, может представлять собой метаболон гликолиза, связанный с белками внешней мембраны митохондрий проростков гороха.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные указывают на олигомерную комплексную организацию митохондриального протеома этиолированных побегов гороха. Многие белки обнаружены в составе надмолекулярных ассоциаций, таких как: (а) суперкомплексы системы ОКСФОС; (б) высокомолекулярные ассоциации, включающие ферменты цикла Кребса; (с) пока неизученные комплексы белков, осуществляющих процессинг нуклеиновых кислот (PPR-комплексы, прото-сплайсосомы); (д) хорошо изученный комплекс БТШ60 и мало изу-

ченные высокомолекулярные ассоциации прохитинов, а также другие суперструктуры. Значительная часть идентифицированных белков в протеоме изученных митохондрий представлена ферментами системы ОКСФОС, что вполне ожидаемо в связи с важной энергообразующей функцией этих органелл. Идентификация белков других компартментов клетки в составе митохондрий может свидетельствовать не только об их функциональном, но и физическом взаимодействии с митохондриями. Дальнейшие исследования с применением современных методов электронной микроскопии, электрофоретического анализа и других методов позволят прояснить структуру и функциональную значимость таких взаимодействий. Учитывая постоянное обновление существующих баз данных, а также успехи в расшифровке геномов различных видов, можно ожидать появления новых данных относительно комплекса гороха и других видов растений, которые расширят наше понимание организации метаболических путей в изучаемых органеллах.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Millar A. H., Heazlewood J. L., Kristensen B. K., Braun H.-P., Møller I. M. The plant mitochondrial proteome // Trends in Plant Science. 2005. Vol. 10, no. 1. P. 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.12.002>.
2. Salvato F., Havelund J. F., Chen M., Rao R. S. P., Rogowska-Wrzesinska A., Jensen O. N., et al. The potato tuber mitochondrial proteome // Plant Physiology. 2014. Vol. 164, no. 2. P. 637–653. <https://doi.org/10.1104/pp.113.229054>.
3. Morgenstern M., Stiller S. B., Lübbert P., Peikert C. D., Dannenmaier S., Drepper F., et al. Definition of a high-confidence mitochondrial proteome at quantitative scale // Cell reports. 2017. Vol. 19, no 13. P. 2836–2852. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.014>.
4. Pagliarin D. J., Calvo S. E., Chang B., Sheth S. A., Vafai S. B., Ong S.-E., et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology // Cell. 2008. Vol. 134, no. 1. P. 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.016>.
5. Dubinin J., Braun H.-P., Schmitz U., Colditz F. The mitochondrial proteome of the model legume *Medicago truncatula* // Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics. 2011. Vol. 1814, no. 12. P. 1658–1668. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.08.008>.
6. Senkler J., Senkler M., Eubel H., Hildebrandt T., Lengwenus C., Schertl P., et al. The mitochondrial complexome of *Arabidopsis thaliana* // The Plant Journal. 2017. Vol. 89, no. 6. P. 1079–1092. <https://doi.org/10.1111/tpj.13448>.
7. Rode C., Senkler M., Klodmann J., Winkelmann T., Braun H. P. GelMap-a novel software tool for building and presenting proteome reference maps // Journal of Proteomics. 2011. Vol. 74, no. 10. P. 2214–2219. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.017>.
8. Ukolova I. V., Kondakova M. A., Kondratov I. G., Sidorov A. V., Borovskii G. B., Voinikov V. K. New insights into the organisation of the oxidative phosphorylation system in the example of pea shoot mitochondria // Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics. 2020. Vol. 1861, no. 11. Art. 148264. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.148264>.
9. Sunderhaus S., Eubel H., Braun H. P. Two-dimensional blue native/blue native polyacrylamide gel electrophoresis for the characterization of mitochondrial protein complexes and supercomplexes // Methods in Molecular Biology. 2007. Vol. 372. P. 315–324. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_23.
10. Wittig I., Schägger H. Electrophoretic methods to isolate protein complexes from mitochondria // Methods in Cell Biology. 2007. Vol. 80. P. 723–741. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)80033-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80033-6).
11. Taylor N. L., Heazlewood J. L., Day D. A., Millar A. H. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome // Molecular and Cellular Proteomics. 2005. Vol. 4, no. 8. P. 1122–1133. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400210-MCP200>.
12. Schlame M. Protein crowding in the inner mitochondrial membrane // Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics. 2021. Vol. 1862, no. 1. Art. 148305. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.148305>.
13. Sumegi B., Srere P. A. Complex I binds several mitochondrial NAD-coupled dehydrogenases // The Journal of Biological Chemistry. 1984. Vol. 259, no. 24. P. 15040–15045.
14. Zhang Y., Beard K. F. M., Swart C., Bergmann S., Krahnert I., Nikoloski Z., et al. Protein-protein interactions and metabolite channelling in the plant tricarboxylic acid cycle // Nature Communications. 2017. Vol. 8. Art. 15212. <https://doi.org/>

10.1038/ncomms15212.

15. Diez T. A., Wurtele E. S., Nikolau B. J. Purification and characterization of 3-methylcrotonyl-coenzyme-A carboxylase from leaves of *Zea mays* // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1994. Vol. 310, no. 1. P. 64–75. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1141>.

16. Pemberton T. A., Srivastava D., Sanyal N., Henzl M. T., Becker D. F., Tanner J. J. Structural studies of yeast $\Delta(1)$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (ALDH4A1): active site flexibility and oligomeric state // *Biochemistry*. 2014. Vol. 53, no. 8. P. 1350–1359. <https://doi.org/10.1021/bi500048b>.

17. Schmitz-Linneweber C., Lampe M.-K., Sultan L. D., Ostersetzer-Biran O. Organellar maturases: A window into the evolution of the spliceosome // *Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics*. 2015. Vol. 1847, no. 9. P. 798–808. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.01.009>.

18. Pfanner N., Warscheid B., Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2019. Vol. 20, no. 5. P. 267–284. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0092-0>.

19. Klodmann J., Senkler M., Rode C., Braun H. P. Defining the protein complex proteome of plant mitochondria // *Plant Physiology*. 2011. Vol. 157, no. 2. P. 587–598. <https://doi.org/10.1104/pp.111.182352>.

20. Kiirika L. M., Behrens C., Braun H. P., Colditz F. The mitochondrial complexome of *Medicago truncatula* // *Frontiers in Plant Science*. 2013. Vol. 4. Art. 84. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00084>.

21. Nury H., Dahout-Gonzalez C., Trézéguet V., Lauquin G., Brandolin G., Pebay-Peyroula E. Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers // *FEBS Letters*. 2005. Vol. 579, no. 27. P. 6031–6036. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.061>.

22. Mamaev D. V., Aliverdieva D. A., Bondarenko D. I., Sholtz K. F. Study of active site topography of rat liver mitochondrial dicarboxylate transporter using lipophilic substrate derivatives // *Biochemistry (Moscow)*. 2006. Vol. 71, no. 7. P. 800–809. <https://doi.org/10.1134/s0006297906070133>.

23. Kunji E. R. S., Ruprecht J. J. The mitochondrial ADP/ATP carrier exists and functions as a monomer // *Biochemical Society Transactions*. 2020. Vol. 48, no. 4. P. 1419–1432. <https://doi.org/10.1042/BST20190933>.

24. Graham J. W., Williams T. C. R., Morgan M., Fernie A. R., Ratcliffe R. G., Sweetlove L. J. Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling // *Plant Cell*. 2007. Vol. 19, no. 11. P. 3723–3738. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.053371>.

REFERENCES

1. Millar A. H., Heazlewood J. L., Kristensen B. K., Braun H.-P., Møller I. M. The plant mitochondrial proteome. *Trends in Plant Science*. 2005;10(1):36–43. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.12.002>.

2. Salvato F., Havelund J. F., Chen M., Rao R. S. P., Rogowska-Wrzesinska A., Jensen O. N., et al. The potato tuber mitochondrial proteome. *Plant Physiology*. 2014;164(2):637–653. <https://doi.org/10.1104/pp.113.229054>.

3. Morgenstern M., Stiller S. B., Lübbert P., Peikert C. D., Dannenmaier S., Drepper F., et al. Definition of a high-confidence mitochondrial proteome at quantitative scale. *Cell reports*. 2017;19(13):2836–2852. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.014>.

4. Pagliarin D. J., Calvo S. E., Chang B., Sheth S. A., Vafai S. B., Ong S.-E., et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*. 2008;134(1):112–123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.016>.

5. Dubinin J., Braun H.-P., Schmitz U., Colditz F. The mitochondrial proteome of the model legume *Medicago truncatula*. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*. 2011;1814(12):1658–1668. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.08.008>.

6. Senkler J., Senkler M., Eubel H., Hildebrandt T., Lengwenus C., Schertl P., et al. The mitochondrial complexome of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 2017;89(6):1079–1092. <https://doi.org/10.1111/tpj.13448>.

7. Rode C., Senkler M., Klodmann J., Winkel-

mann T., Braun H. P. GelMap-a novel software tool for building and presenting proteome reference maps. *Journal of Proteomics*. 2011;74(10):2214–2219. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.017>.

8. Ukolova I. V., Kondakova M. A., Kondratov I. G., Sidorov A. V., Borovskii G. B., Voinikov V. K. New insights into the organisation of the oxidative phosphorylation system in the example of pea shoot mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics*. 2020;1861(11). Art. 148264. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148264>.

9. Sunderhaus S., Eubel H., Braun H. P. Two-dimensional blue native/blue native polyacrylamide gel electrophoresis for the characterization of mitochondrial protein complexes and supercomplexes. *Methods in Molecular Biology*. 2007;372:315–324. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_23.

10. Wittig I., Schägger H. Electrophoretic methods to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods in Cell Biology*. 2007;80:723–741. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)80033-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80033-6).

11. Taylor N. L., Heazlewood J. L., Day D. A., Millar A. H. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2005;4(8):1122–1133. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400210-MCP200>.

12. Schlame M. Protein crowding in the inner mitochondrial membrane. *Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics*. 2021;1862(1). Art. 148305. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148305>.

13. Sumegi B., Srere P. A. Complex I binds several mitochondrial NAD-coupled dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry*. 1984;259(24):15040–15045.
14. Zhang Y., Beard K. F. M., Swart C., Bergmann S., Krahner I., Nikoloski Z., et al. Protein-protein interactions and metabolite channelling in the plant tricarboxylic acid cycle. *Nature Communications*. 2017;8. Art. 15212. <https://doi.org/10.1038/ncomms15212>.
15. Diez T. A., Wurtele E. S., Nikolau B. J. Purification and characterization of 3-methylcrotonyl-coenzyme-A carboxylase from leaves of *Zea mays*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1994;310(1):64–75. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1141>.
16. Pemberton T. A., Srivastava D., Sanyal N., Henzl M. T., Becker D. F., Tanner J. J. Structural studies of yeast $\Delta(1)$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (ALDH4A1): active site flexibility and oligomeric state. *Biochemistry*. 2014;53(8):1350–1359. <https://doi.org/10.1021/bi500048b>.
17. Schmitz-Linneweber C., Lampe M.-K., Sultan L. D., Ostersetzer-Biran O. Organellar maturases: A window into the evolution of the spliceosome. *Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics*. 2015;1847(9):798–808. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.01.009>.
18. Pfanner N., Warscheid B., Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2019;20(5):267–284. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0092-0>.
19. Klodmann J., Senkler M., Rode C., Braun H. P. Defining the protein complex proteome of plant mitochondria. *Plant Physiology*. 2011;157(2):587–598. <https://doi.org/10.1104/pp.111.182352>.
20. Kiirika L. M., Behrens C., Braun H. P., Colclitz F. The mitochondrial complexome of *Medicago truncatula*. *Frontiers in Plant Science*. 2013;4. Art. 84. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00084>.
21. Nury H., Dahout-Gonzalez C., Trézéguet V., Lauquin G., Brandolin G., Pebay-Peyroula E. Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers. *FEBS Letters*. 2005;579(27):6031–6036. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.061>.
22. Mamaev D. V., Aliverdieva D. A., Bondarenko D. I., Sholtz K. F. Study of active site topography of rat liver mitochondrial dicarboxylate transporter using lipophilic substrate derivatives. *Biochemistry (Moscow)*. 2006;71(7):800–809. <https://doi.org/10.1134/s0006297906070133>.
23. Kunji E. R. S., Ruprecht J. J. The mitochondrial ADP/ATP carrier exists and functions as a monomer. *Biochemical Society Transactions*. 2020;48(4):1419–1432. <https://doi.org/10.1042/BST20190933>.
24. Graham J. W., Williams T. C. R., Morgan M., Fernie A. R., Ratcliffe R. G., Sweetlove L. J. Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell*. 2007;19(11):3723–3738. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.053371>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

И. В. Уколова,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
irinastupnikova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9167-9316>

И. Г. Кондратов,

к.б.н., научный сотрудник,
Научный центр проблем здоровья семьи
и репродукции человека,
664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16,
Российская Федерация,
kondratovig@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

М. А. Кондакова,

к.б.н., ведущий инженер,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
kondakova-marina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3859-9138>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina V. Ukolova,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: irinastupnikova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9167-9316>

Ilya G. Kondratov,

Cand. Sci. (Biology), Research Scientist,
Scientific Centre for Family Health and Human
Reproduction Problems,
16, Timiriazeva St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
kondratovig@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Marina A. Kondakova,

Cand. Sci. (Biology), Lead Engineer,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
kondakova-marina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3859-9138>

И. В. Любушкина,

к.б.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация;
доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
ostrov1873@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6692-4482>

О. И. Грабельных,

д.б.н., 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,
grolga@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4220-6608>

Г. Б. Боровский,

д.б.н., профессор, главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5089-5311>

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.*

Информация о статье

*Поступила в редакцию 04.10.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.*

Irina V. Lyubushkina,

Cand. Sci. (Biology), Research Scientist
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation;
Assistant Professor,
Irkutsk State University,
1, K. Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
ostrov1873@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6692-4482>

Olga I. Grabelnykh,

Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher,
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: grolga@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4220-6608>

Gennadii B. Borovskii,

Dr. Sci. (Biology), Professor,
Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5089-5311>

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.*

Information about the article

*The article was submitted 04.10.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.*

Научная статья

УДК 582.284:619:616.33/34

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-581-589>



Влияние препарата Траметин, получаемого на основе грибов-ксилотрофов из рода *Trametes*, на биосинтез интерферонов и его профилактическую активность против респираторных заболеваний телят

Вера Александровна Чхенкели

Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Чхенкели Вера Александровна, chkhenkeli@rambler.ru

Аннотация. В условиях распространения бактериально-вирусных заболеваний у молодняка сельскохозяйственных животных актуальное значение приобрело использование интерферонов и препаратов, влияющих на стимуляцию их биосинтеза. Ранее нами было исследовано влияние ветеринарного препарата Траметин, получаемого на основе гриба-ксилотрофа *Trametes pubescens* (Shumach.: Fr.) Pilat., на процесс биосинтеза интерферонов в крови мышей. Цель настоящей работы – изучение динамики биосинтеза α - и γ -интерферонов при использовании Траметина и исследование его профилактической активности у телят. Показано, что однократное пероральное введение Траметина в дозах от 15 до 60 мг/кг вызывало дозозависимую индукцию и продукцию γ -интерферона в крови мышей, максимальное содержание которого через 48 ч после введения в дозе 30 мг/кг составляло $1337,0 \pm 93,0$ пкг/мл. При увеличении дозы Траметина от 15 до 30 мг/кг уровень продукции α -интерферона через 48 ч после введения увеличивался до $1388,0 \pm 84,0$ пкг/мл. При этом уровень продукции α -интерферона под действием Циклоферона в дозе 4,5 мг/кг составил $1455,47 \pm 84,2$ пкг/мл, γ -интерферона – $1447,0 \pm 90,0$ пкг/мл. Иммуностимулирующие свойства Траметина были подтверждены в научно-хозяйственном эксперименте на телятах с пониженным иммунитетом. В нашей работе критериями профилактической активности Траметина и Циклоферона являлось иммунологическое исследование крови телят до и после применения препаратов. Профилактическая эффективность препарата Траметин подтверждается повышением фагоцитарной активности на 10,5%, фагоцитарного индекса – на 61,8%, фагоцитарного числа – на 52,8%. Бактерицидная активность сыворотки после применения Траметина повышается на 60%. Аналогичным иммуностимулирующим действием обладает и Циклоферон. Показано, что неспецифическая профилактика Траметином позволяет снизить заболеваемость молодняка бактериально-вирусными респираторными заболеваниями и в целом повысить иммунитет телят.

Ключевые слова: Траметин, Циклоферон, интерферон, иммунный статус, мышцы, телята

Для цитирования: Чхенкели В. А. Влияние препарата Траметин, получаемого на основе грибов-ксилотрофов из рода *Trametes*, на биосинтез интерферонов и его профилактическую активность против респираторных заболеваний телят // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 581–589. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-581-589>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Veterinary drug Trametin obtained on the basis of *Trametes pubescens* xylotroph fungi: its effect on the biosynthesis of interferons and its prophylactic activity against calf respiratory diseases

Vera A. Chkhenkeli

Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

Corresponding author: Vera A. Chkhenkeli, chkhenkeli@rambler.ru

Abstract. Given the spread of bacterial and viral diseases in young farm animals, the use of interferons and drugs to stimulate their biosynthesis has gained relevance. In a previous study, we examined the effect of a veterinary drug Trametin produced on the basis of *Trametes pubescens* (Shumach.: Fr.) Pilat. on the biosynthesis of interferons in the blood of mice. The present work is aimed at studying the biosynthesis dynamics of α - and γ -interferons when using Trametin and studying its prophylactic activity in calves. It is shown that a single oral administration of Trametin in doses ranging from 15 to 60 mg/kg causes a dose-dependent induction and production of γ -interferon in the blood of mice, whose maximum content reaches 1337.0 ± 93.0 pg/mL at 48 h after administering a dose of 30 mg/kg. With a Trametin dose increase from 15 to 30 mg/kg, the level of α -interferon production rises to 1388.0 ± 84.0 pg/mL at 48 h after administration. At a Cycloferon dose of 4.5 mg/kg, the production level of α -interferon and γ -interferon amounts to 1455.47 ± 84.2 and 1447.0 ± 90.0 pg/mL, respectively. The immunostimulatory properties of Trametin are confirmed by a scientific and economic experiment conducted using immunocompromised calves. In our studies, an immunological test of calf blood performed prior to and following the administration of Trametin and Cycloferon constitutes criteria for the prophylactic activity of these drugs. The prophylactic efficacy of Trametin is confirmed by an increase in phagocytic activity by 10.5%, phagocytic index by 61.8%, and phagocytic number by 52.8%. After Trametin administration, the bactericidal activity of the serum increases by 60%. Cycloferon exhibits a similar immunostimulatory effect. Nonspecific prophylaxis using Trametin is shown to reduce the incidence of bacterial and viral respiratory diseases in young calves and generally improve their immunity.

Keywords: Trametin, Cycloferon, interferon, immune status, mice, calves

For citation: Chkhenkeli V. A. Veterinary drug Trametin obtained on the basis of *Trametes pubescens* xylophagous fungi: its effect on the biosynthesis of interferons and its prophylactic activity against calf respiratory diseases. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):581-589. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-581-589>.

ВВЕДЕНИЕ

С начала XXI века наблюдается стремительное развитие смешанных инфекций вирусной и бактериальной природы, что осложняет не только диагностику заболеваний, но и их специфическую и неспецифическую профилактику и терапию. В связи с этим в условиях импортозамещения особую значимость приобретает разработка новых отечественных препаратов, обладающих иммуномодулирующими свойствами, проявляющих противовирусное и антибактериальное действие непосредственно или опосредованно за счет стимуляции иммунной системы, повышающих иммуногенность существующих вакцин [1–5]. На сегодняшний день большое значение приобрело использование в медицинской и ветеринарной практике как непосредственно препаратов интерферонов, так и препаратов, влияющих на стимуляцию биосинтеза интерферонов, являющихся факторами неспецифической резистентности организма¹ [6–12]. Универсальные свойства интерферонов различных классов, которые делают их одним из важнейших факторов неспецифической резистентности, позволили ввести интегральный показатель иммунитета – «интерфероновый статус» (ИФН-статус). Лекарственные средства, способствующие повышению биосинтеза интерферонов, относят к группе индукторов. При этом действующие вещества индукторов могут быть как натурального, так и синтетического происхождения. Благодаря проведению курса неспецифической профилактики таки-

ми лекарственными средствами можно на длительное время обеспечить повышенный уровень в крови интерферонов различных классов.

Существование в организме животных высококомпетентной и подверженной действию многих факторов подвижной системы интерферонов, которая сформировалась в процессе эволюции, и многообразие обнаруженных эффектов и изученных к настоящему времени физиологических функций различных классов интерферонов, безусловно, указывает на их регуляторную роль в сохранении гомеостаза организма [10]. ИФН-статус играет важную роль в системе иммунитета, а благодаря своей универсальности во многом превосходит значение некоторых других неспецифических факторов иммунитета [13–16]. Необходимость исследования динамики изменений ИФН-статуса при испытаниях новых препаратов-иммуномодуляторов, разработке схем их применения диктуется концептуальным подходом, предусматривающим правильное и рациональное использование системы интерферона как терапевтического средства, формирующего неспецифическую резистентность к вирусным заболеваниям в норме и действующего при естественном выздоровлении при патологии.

Наряду со специфической профилактикой инфекционных респираторных заболеваний в животноводстве применяют сыворотки, бактериофаги, нормальные иммуноглобулины сывороток крови животных, иммуномодулирующие препараты, пробиотики. В последнее время осо-

¹Чхенкели В.А. Иммунология: учеб. пособие. СПб. Проспект науки. 2015. 144 с.

бое внимание уделяется использованию препаратов, получаемых на основе природного сырья, каким является и препарат полифункционального действия Траметин, созданный на основе дегидроаутолизующего гриба *T. pubescens*.

Цель настоящей работы состояла в изучении динамики биосинтеза α - и γ -интерферонов под влиянием ветеринарного препарата Траметин у лабораторных животных (мышей) и исследование его профилактической активности у телят.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ветеринарный препарат Траметин производится с использованием методов биотехнологии на основе гриба-ксилотрофа *Trametes pubescens* (Shumacher: Fr.) Pilat. штамм 0663, полученного из коллекции грибов лаборатории биохимии грибов Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН (г. Санкт-Петербург) [17, 18].

Эксперименты по определению интерферогенных свойств препарата Траметин проводили в опытах *in vitro* на белых беспородных мышках (самцы с массой тела 18–20 г) в сравнительном аспекте с препаратом Циклоферон, который, как известно, индуцирует выработку всех типов интерферонов. 1 мл Циклоферона содержит 12 мг меглумаина акридоната (в пересчете на акридонуксусную кислоту). Меглумаина акридоната является низкомолекулярным индуктором интерферона, что определяет широкий спектр его биологической активности (противовирусной, противовоспалительной, иммуномодулирующей). Основными клетками-продуцентами интерферона после введения препарата являются макрофаги, Т- и В-лимфоциты. В зависимости от типа инфекции имеет место преобладание активности того или иного звена иммунитета. Препарат индуцирует высокие титры интерферона в органах и тканях, содержащих лимфоидные элементы (селезенка, печень, легкие), активирует стволовые клетки костного мозга, стимулируя образование гранулоцитов. Циклоферон активирует Т-лимфоциты и естественные киллерные клетки, нормализует баланс между субпопуляциями Т-хелперов и Т-супрессоров, усиливает активность α -интерферонов.

Содержание, питание и уход за животными в ходе эксперимента осуществлялись в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом Минздрава России от 23.08.2010 г. № 708н. Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдались в соответствии с European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Перед исследованием животные подвергались 5-дневному карантину.

Для определения ИФН-статуса α - и γ -интерферонов в сыворотке крови мышей был применен метод твердофазного иммуноферментного

анализа (ИФА) с использованием набора реагентов А-8758 и А-8752 (АО «Вектор-Бест», Россия), предназначенных, соответственно, для определения уровня α - и γ -интерферонов. Измерения проводились при длине волны 450 нм.

Однако отечественные тест-системы показали низкий и недостоверный уровень содержания интерферонов, поэтому в дальнейшем использовали тест-системы зарубежного производства. В связи с этим количественное содержание α -, γ -интерферонов в сыворотке крови мышей определяли методом ИФА с использованием следующих коммерческих тест-систем согласно инструкции производителя: Mouse IFN-alpha ELISA Kit, Research & Diagnostics (R & D) Systems (США); Mouse IFN-gamma ELISA Kit, R & D Systems Europe Ltd (Великобритания). Для измерений использовали ИФА-комплекс Human (Германия). Измерения проводились также при длине волны 450 нм.

Через 6, 24, 48 и 72 ч мыши были декапитированы. В полученных образцах сыворотки крови тестировали уровень α - и γ -интерферонов методом твердофазного ИФА. Мышей выдерживали под легким эфирным наркозом до исчезновения ноцицептивных рефлексов. Забор крови проводили методом декапитации в стерильных условиях. Образцы крови, полученные в каждый срок исследования, состояли из пула (смеси) крови от 2 мышей в объеме 2 мл (по 1 мл от каждой особи), из которого после центрифугирования в режиме 5000 об./мин 15 мин отбирали сыворотку в объеме 1,0 мл в стерильные пробирки типа Эппендорф. Сыворотки крови мышей, соответствующие каждому сроку забора, разделяли на аликвоты по 0,3 мл в 3 стерильные пробирки Эппендорф, которые до проведения соответствующего ИФА хранили при температуре -70 °С.

Содержание α -, γ -ИФН в пробах сыворотки определялось в пяти временных сроках – 6, 24, 48, 72 и 96 ч (по 2 мыши в каждый срок) после однократного перорального введения препаратов Траметин и Циклоферон.

Научно-хозяйственный эксперимент по неспецифической профилактике респираторных болезней телят проводили на базе молочно-товарной фермы ООО МИП «Новоямское» Иркутского района, на которой, по данным анализа эпизоотологической ситуации по респираторным заболеваниям по Иркутской области за период с 2011 по 2018 гг., по данным службы ветеринарии Иркутской области, а именно, отдела организации противоэпизоотических мероприятий, лечебной и лабораторной работы, наблюдали повышение заболеваемости телят смешанными респираторными инфекциями [2]. Схемы проведения научно-хозяйственных экспериментов по профилактике респираторных болезней составляли на основе ранее проведенных лабораторных экспериментов. Группы животных набирали

по принципу аналогов (по 8 голов). Профилактику осуществляли в течение 10 сут. в дозах 20, 40, 60 мг/гол. препарата Траметин. В качестве препарата сравнения использовали Циклоферон в дозе 3,0 мг/гол. в сутки для профилактики в течение 10 дней.

Гематологические исследования проводили согласно общепринятым методикам с использованием ветеринарного автоматического гематологического анализатора VetAbc (Франция) [19].

Биохимические показатели определяли по общепринятым методикам с использованием биохимического анализатора Rayto 1904C (Китай), тест-систем для биохимических анализаторов фирмы Cormay (Польша)².

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли в соответствии с общепринятыми методиками с использованием программных пакетов Microsoft Excel³ [20].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для определения оптимальной концентрации Траметина на образование α -интерферона у мышей было создано 6 групп по принципу аналогов (по 8 животных): 1-я группа – контрольная; 2-я – контрольная, при введении 0,2 мл перорально физиологического раствора – плацебо; 3-я – экспериментальная, при введении 0,2 мл препарата Траметин перорально в разведении 1:20; 4-я – экспериментальная, 0,2 мл препарата Траметин в разведении 1:10; 5-я – экспериментальная, 0,2 мл препарата Траметин в разведении 1:5; 6-я – экспериментальная, 3,0 мл препарата Циклоферон в разведении 1:30 при содержании 125 мг/мл меглюмина акридоната в 1 мл Циклоферона).

Расчет оптической плотности исследуемых проб проводили с последующей обработкой и преобразованием данных оптической плотности в пиктограммы в мл (пкг/мл). Все исследования проводили в трехкратной повторности. Данные по влия-

нию препаратов на содержание α -интерферона в сыворотке крови мышей представлены в табл. 1.

Однократное пероральное введение Траметина в дозах от 15 до 60 мг/кг вызывало дозозависимую индукцию и продукцию α -ИФН в сыворотке крови мышей, максимальное содержание которого через 48 ч после введения препарата в дозе 30 мг/кг составляло $1337 \pm 93,0$ ПКГ/мл. Уровень продукции α -ИФН в сыворотке крови мышей под действием Циклоферона в дозе 4,5 мг/кг несколько превышал уровень α -ИФН под действием Траметина и составлял $1447,0 \pm 90,0$ кг/мл.

При увеличении дозы Траметина от 15 до 30 мг/кг уровень продукции α -ИФН увеличивался более чем в 7,5 раз, а по сравнению с контролем – более чем в 49 раз. Повышение дозы Траметина более 30 мг/кг (до 60 мг/кг) не приводит к увеличению синтеза интерферонов. Установлено, что однократное пероральное введение Траметина в дозах от 15 до 60 мг/кг вызывало дозозависимую индукцию и продукцию α -ИФН в сыворотке крови мышей, максимальное содержание которого через 48 ч после введения препарата Траметин в дозе 30 мг/кг составляло $1338 \pm 84,0$ ПКГ/мл. Уровень продукции α -ИФН в сыворотке крови мышей под действием Циклоферона в дозе 4,5 мг/кг несколько превышал уровень α -ИФН под действием Траметина и составлял $1455,47 \pm 84,2$ ПКГ/мл.

Определение оптимальной концентрации Траметина на образование γ -ИФН у мышей проводилось на 6 группах животных аналогично определению концентрации Траметина на образование α -интерферона. Мыши были декапитированы также через 6, 24, 48 и 72 и 96 ч. В полученных образцах сыворотки крови лабораторных животных методом ИФА тестировали уровень γ -интерферона. Данные по влиянию препаратов на содержание γ -интерферонов в сыворотке крови представлены в табл. 2.

Таблица 1. Динамика содержания α -интерферонов в сыворотке крови мышей при однократном введении препаратов

Table 1. Dynamics of α -interferons content in mouse blood serum after a single introduction of drugs

Группа	Содержание α -ИФН, ПКГ/мл, в сыворотке крови через различные сроки после введения препаратов, ч				
	6	24	48	72	96
Контрольная	4,4 $\pm$ 1,2	3,1 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,3	3,4 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,6
Плацебо (0,2 мл физ. р-ра)	4,8 $\pm$ 1,2	3,6 $\pm$ 0,5	3,20 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 0,1
Траметин (0,2 мл в разведении 1:20, 15 мг/кг)	6,4 $\pm$ 1,2	18,6 $\pm$ 1,2	444,1 $\pm$ 11,0	10,4 $\pm$ 0,5	5,4 $\pm$ 0,3
Траметин (0,2 мл в разведении 1:10, 30 мг/кг)	38,6 $\pm$ 1,2	443,5 $\pm$ 23,5	1338,0 $\pm$ 84,0	273,8 $\pm$ 12,6	125,4 $\pm$ 9,6
Траметин (0,2 мл в разведении 1:5, 60 мг/кг)	8,5 $\pm$ 1,3	4486,3 $\pm$ 1,2	1450,2 $\pm$ 12,3	283,7 $\pm$ 2,7	132,5 $\pm$ 3,1
Циклоферон (0,2 мл в разведении 1:30, 4,5 мг/кг)	45,9 $\pm$ 1,2	525,7 $\pm$ 32,4	1455,47 $\pm$ 84,2	374,2 $\pm$ 21,3	132,7 $\pm$ 7,8

²Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. 3-е изд. М.: МЕДпресс-информ, 2009. 896 с.

³Аблов А. М., Батомункуев А. С., Анганова Е. В., Мельцов И. В. Применение статистических методов при анализе эпизоотической ситуации по инфекционным болезням животных и птиц: методические рекомендации. Иркутск: ИргСХА, 2014. 25 с.

Таблица 2. Динамика содержания γ -интерферонов в сыворотке крови мышей при однократном введении препаратов

Table 2. Dynamics of γ -interferons content in mouse blood serum after a single introduction of drugs

Группа	Содержание γ -ИФН, пкг/мл, в сыворотке крови через различные сроки, ч				
	6	24	48	72	96
Контрольная	1,5 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,3
Плацебо (0,2 мл физ. р-ра)	1,6 $\pm$ 0,8	3,2 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,3
Траметин (0,2 мл в разведении 1:20, 15 мг/кг)	10,2 $\pm$ 0,4	12,6 $\pm$ 1,1	176 $\pm$ 1,0	10,4 $\pm$ 1,0	5,4 $\pm$ 0,2
Траметин (0,2 мл в разведении 1:10, 30 мг/кг)	38,6 $\pm$ 1,3	436,5 $\pm$ 7,5	1337 $\pm$ 93,0	273,8 $\pm$ 7,8	125,4 $\pm$ 3,5
Траметин (0,2 мл в разведении 1:5, 60 мг/кг)	20,5 $\pm$ 1,1	442,3 $\pm$ 2,5	1338,2 $\pm$ 32,5	281,7 $\pm$ 2,7	129,5 $\pm$ 2,1
Циклоферон (0,2 мл в разведении 1:30, 4,5 мг/кг)	45,9 $\pm$ 2,3	546,7 $\pm$ 8,9	1447 $\pm$ 90,0	374,2 $\pm$ 3,9	132,7 $\pm$ 1,5

У телят первой группы, получавших препарат Траметин, отмечали улучшение общего состояния, увеличение привеса, а при дальнейшем наблюдении и увеличение сопротивляемости другим заболеваниям.

Изменения некоторых гематологических и биохимических показателей крови при профилактике препаратом Траметин в дозе 30 мл на голову в течение 5 дней и Цилофероном в дозе 3,0 мл/гол. (при содержании 125 мг/мл меглюми-на акридоната в 1 мл Циклоферона) представлены в табл. 3 и 4.

Гематологические исследования показали, что при профилактике препаратом Траметин содержание эритроцитов в крови телят увеличилось на 44,4%, тромбоцитов – на 100,9 %, гематокрита – на 70,0%, гемоглобина – на 46,9%. При профилактике Циклофероном содержание эритроцитов в крови повысилось на 57,3%, тромбо-

цитов – на 250,0%, гемоглобина – на 4,3%. При проведении биохимических исследований установлено, что при профилактике препаратом Траметин уровень глюкозы в крови увеличивается на 22,9%, белка – на 4,1%, при профилактике Циклофероном содержание белка в сыворотке крови практически не изменяется, а уровень глюкозы в крови увеличивается на 14,3%.

Пониженное содержание макроэлементов (калия, кальция, фосфора) свидетельствует о необходимости введения в рацион телят минеральных добавок, отсутствие которых в рационе животных может привести к гипокальциемии и, следовательно, к рахиту, гипофосфатемии (деминерализации скелета) и другим заболеваниям. Недостаток железа в рационе телят вызывает снижение синтеза гемоглобина, что приводит к анемии, потере аппетита, замедлению роста, повышенной восприимчивости к заболеваниям.

Таблица 3. Изменение гематологических показателей при профилактике респираторных заболеваний телят

Table 3. Changes in hematological parameters during the prevention of respiratory diseases in calves

Параметр	Норма	Контроль		Траметин		Циклоферон	
		до эксперимента	после эксперимента	до профилактики	после профилактики	до профилактики	после профилактики
WBC, 10^9	6,1–9,1, 10^9	25,9 $\pm$ 0,2	25,5 $\pm$ 2,1	28,3 $\pm$ 2,3	12,3 $\pm$ 0,2	22,7 $\pm$ 0,2	11,7 $\pm$ 0,1
RBC, 10^{12}	5,0–7,5, 10^{12}	3,36 $\pm$ 2,0	1,26 $\pm$ 0,3	1,76 $\pm$ 0,3	8,76 $\pm$ 0,2	6,7 $\pm$ 0,1	10,3 $\pm$ 0,2
HGB, г/л	90,0–140,0	40,0 $\pm$ 0,4	47,0 $\pm$ 0,3	64,0 $\pm$ 0,2	94,0 $\pm$ 7,8	68,0 $\pm$ 0,2	97,0 $\pm$ 2,0
HCT	–	13,7 $\pm$ 0,1	6,8 $\pm$ 0,2	9,4 $\pm$ 0,1	32,9 $\pm$ 1,2	23,3 $\pm$ 0,1	39,3 $\pm$ 1,1
MCV	–	40,8 $\pm$ 0,4	53,1 $\pm$ 0,2	37,6 $\pm$ 0,4	53,4 $\pm$ 0,5	38,4 $\pm$ 0,3	38,3 $\pm$ 0,3
MCH	–	11,9 $\pm$ 0,2	36,7 $\pm$ 0,3	10,7 $\pm$ 0,2	36,4 $\pm$ 1,3	11,0 $\pm$ 0,1	10,4 $\pm$ 0,1
MCHC	–	290 $\pm$ 3,2	256,0 $\pm$ 1,2	286,0 $\pm$ 3,2	272,0 $\pm$ 1,2	287,0 $\pm$ 1,8	272,0 $\pm$ 1,2
PLT, 10^9	–	236,0 $\pm$ 2,1	318,0 $\pm$ 2,1	327,0 $\pm$ 23,4	661,0 $\pm$ 2,4	320,0 $\pm$ 2,1	660,0 $\pm$ 2,4
Lym	3,3–10,1	21,4 $\pm$ 0,3	23,5 $\pm$ 0,6	6,6 $\pm$ 0,3	7,6 $\pm$ 0,2	19,0 $\pm$ 1,1	6,5 $\pm$ 0,5
Mon	–	1,1 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,6	4,0 $\pm$ 0,4	1,30 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,4
Gra	–	3,4 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	16,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,02	2,4 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,6
Lym, %	40–65	82,4 $\pm$ 0,2	92,3 $\pm$ 0,1	23,3 $\pm$ 0,2	61,6 $\pm$ 0,3	87,6 $\pm$ 0,5	55,6 $\pm$ 0,5
Mon, %	2–7	4,2 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,1	18,0 $\pm$ 0,1	32,1 $\pm$ 0,2	5,7 $\pm$ 0,1	22,4 $\pm$ 0,1
Gra, %	–	13,4 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,3	58,7 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 0,1	10,7 $\pm$ 0,3	23,0 $\pm$ 0,2
RDW	–	17,4 $\pm$ 0,7	3,5 $\pm$ 0,8	18,8 $\pm$ 0,7	2,7 $\pm$ 0,2	19,7 $\pm$ 1,0	20,3 $\pm$ 0,7
PCT	–	0,4 $\pm$ 0,02	0,5 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,03	0,5 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,03
MPW	–	4,7 $\pm$ 0,6	6,7 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,6	6,7 $\pm$ 0,2	6,7 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 1,37
PDW	–	16,6 $\pm$ 0,3	10,8 $\pm$ 0,1	18,9 $\pm$ 0,3	12,5 $\pm$ 0,1	16,7 $\pm$ 0,3	17,3 $\pm$ 1,1

Примечание. WBC – лейкоциты, клеток/л; RBC – эритроциты, клеток/л; HGB – концентрация гемоглобина; HCT – гематокрит; MCV – среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг; MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците, фмоль; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/л; PLT – тромбоциты, клеток/л; дифференцировка лейкоцитов: Lym, % – лимфоциты; Mon, % – моноциты и некоторые эозинофилы; Gra, % – нейтрофилы, эозинофилы и базофилы; «–» – данных нет в литературе.

Таблица 4. Изменение биохимических показателей при профилактике респираторных заболеваний телят

Table 4. Changes in biochemical parameters during the prevention of respiratory diseases in calves

Показатель	Норма	Контроль		Траметин		Циклоферон	
		до начала эксперимента	после окончания эксперимента	до профилактики	после профилактики	до профилактики	после профилактики
Общий белок, г/л	62,0–82,0	56,5±1,5	57,16±0,2	56,2±0,1	58,5±0,73	56,1±0,5	56,1±0,5
Глюкоза, моль/л	1,9–3,8	3,5±0,1	3,5±0,2	3,5±0,1	4,3±0,01	3,5±0,1	4,0±0,1
Фосфор, моль/л	1,1–2,8	4,4±0,1	4,3±0,3	4,3±0,01	4,3±0,07	4,3±0,1	4,32±0,1
Кальций, моль/л	2,5–2,8	0,9±0,01	1,0±0,06	0,9±0,02	0,9±0,01	0,9±0,03	0,9±0,01
Калий, моль/л	4,0–5,8	33,7±0,1	32,7±0,1	30,3±0,5	31,7±0,9	30,3±0,1	32,3±1,10
Железо, моль/л	16,1–19,7	5,7±0,7	5,6±0,3	5,2±0,4	5,1±0,4	5,26±0,2	5,3±0,4
Хлориды, моль/л	96,1–109,0	52,9±0,2	53,2±0,3	50,4±0,7	53,24±0,4	50,3±0,1	53,1±0,2

Плацента сельскохозяйственных животных непроницаема для антител матери, поэтому молозиво служит единственным источником защиты новорожденных в постнатальный период. Потребление и адсорбция иммуноглобулинов является важнейшим фактором для выживания и нормального развития новорожденных животных. Телята, получавшие молозиво своевременно, более устойчивы в постнатальный период, чем животные, не получавшие молозиво или получавшие его в недостаточном количестве. Поэтому для нас было важно определить иммунный статус у новорожденных телят, обусловленный получением иммуноглобулинов с молозивом. Полученные данные отражены в табл. 5. По результатам исследований иммунного статуса у новорожденных телят, проведенных согласно стандартной методике, у телят всех групп были выявлены признаки умеренного иммунодефицита, что, возможно, связано с условиями содержания телят, временем выпаивания молозива. Определение сывороточных иммуноглобулинов проводилось по результатам реакции преципитации сульфитом натрия. Установлено, что уровень иммуноглобулинов у новорожденных животных понижен – около 15 мг/мл (при этом наблюдали помутнение раствора, хлопья преципитата).

В проводимых нами исследованиях критериями профилактической активности препаратов Траметин и Циклоферон являлось иммунологическое исследование крови телят до и после применения препаратов. Исследования проводились по таким показателям, как фагоцитарная активность (ФА), фагоцитарный индекс (ФИ), фагоцитарное число (ФЧ) и бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК).

Таблица 6. Влияние профилактики препаратами Траметин и Циклоферон на фагоцитарную активность и бактерицидную активность крови телят

Table 6. Effect of preventative treatment using Trametin and Cycloferon on the phagocytic activity and bactericidal activity of the blood of calves

Показатель	Контроль		Траметин		Циклоферон	
	до	после	до	после	до	после
ФА, %	49,7±0,12	49,6±0,2	50,4±0,21	55,7±0,1	48,6±0,24	52,2±0,15
ФИ	4,5±0,23	4,4±0,13	4,3±0,41	6,96±0,14	4,2±0,56	4,82±0,13
ФЧ	6,9±0,1	6,8±0,2	6,41±0,32	9,8±0,12	6,85±0,34	7,7±0,16
БАСК, %	67,1±0,17	67,0±0,31	74,8±0,11	29,8±0,13	67,0±0,15	47,0±0,14

Таблица 5. Определение уровня сывороточных иммуноглобулинов по результатам преципитации сульфитом натрия при профилактическом использовании препаратов Траметин и Циклоферон

Table 5. Determination of the level of serum immunoglobulins based on the results of precipitation with sodium sulfite during the prophylactic use of the drugs Trametin and Cycloferon

Группа	Концентрация сульфита натрия, %		
	14	16	18
Контроль	-	-	-
Траметин	-	+	+
Циклоферон	-	+	+

Примечание. «-» – очень низкий уровень иммуноглобулинов (ниже 5 мг/мл); «+» – оптимальный уровень иммуноглобулинов (более 15 мг/мл).

Фагоцитарная активность, фагоцитарный индекс, фагоцитарное число сыворотки крови у телят находятся несколько ниже нормы или в нижних пределах нормы. Профилактическая эффективность препарата Траметин подтверждается повышением фагоцитарной активности на 10,5%, фагоцитарного индекса – на 61,8%, фагоцитарного числа – на 52,8% (табл. 6). БАСК после применения Траметина повышается на 60%. Аналогичным иммуностимулирующим действием обладает и Циклоферон.

Следовательно, применение препарата Траметин способствует повышению иммунного статуса организма телят. При профилактике препаратом Циклоферон наблюдали незначительное повышение показателей фагоцитарной активности и БАСК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные по интерферогенным свойствам препарата Траметин на примере α - и γ -интерферонов, содержащихся в сыворотке крови мышей, в сравнении с действием препарата Циклоферон при его разведении в 10 раз и введении в дозе 0,2 мг/мл меглюмина акридоната в пересчете на акридонуксусную кислоту, свидетельствуют о том, что наибольший эффект достигается при введении препарата Траметин в разведении 1:10 (в дозе 30 мг/кг) через 48 ч после его введения. Проведенные исследования были под-

тверждены в научно-хозяйственном эксперименте на телятах. Показано, что неспецифическая профилактика препаратом Траметин в дозе 30 мг на голову в течение 5 дней позволяет повысить иммунитет телят, а следовательно, снизить заболеваемость молодняка сельскохозяйственных животных инфекционными болезнями, в том числе и смешанными бактериально-вирусными респираторными заболеваниями. Аналогичным иммуностимулирующим действием обладает и Циклоферон в дозе 3 мг на голову раз в сутки при введении перорально в течение 5 суток.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sharma D., Singh V. P., Singh N. K. A review on phytochemistry and pharmacology of medicinal as well as poisonous mushrooms // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2018. Vol. 18. Issue 13. P. 1095–1109. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170927144119>.
2. Чхенкели В. А. Механизмы действия препарата Траметин на организм животных при ассоциированных инфекциях. СПб: Проспект науки. 2020. 176 с.
3. Чхенкели В. А. Препараты последнего поколения на основе грибов – ксилотрофов рода *Trametes*: обнаруженные эффекты, механизмы действия и применение: монография. М: Перо. 2014. 256 с.
4. Чхенкели В. А., Романова Е. Д., Власов Б. Я. Ветеринарный препарат Траметин и профилактика негативного воздействия экологических факторов на организм. LAP Lambert Academic Publishing RU, 2020. 121 с.
5. Colby C., Chamberlin M. J., Duesberg P. H., Simon M. I. The Specificity of Interferon Induction. In: Beers R. F., Braun W. (eds.). Biological Effects of Polynucleotides: Proceedings of the Symposium on Molecular Biology, June 4–5 1970, New York. Berlin, Heidelberg: Springer. 1971. P. 79–87. https://doi.org/10.1007/978-3-642-85772-0_7.
6. Вахитов Х. М., Пикуза О. И., Вахитова Л. Ф., Закирова А. М., Ризванова Ф. Ф. Индукторы интерферона в профилактике и лечении респираторных инфекций у детей // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2019. Т. 64. N 3. С. 103–108. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2019-64-3-103-108>.
7. Malmgaard L. Induction and regulation of IFNs during viral infections // Journal of Interferon & Cytokine Research. 2004. Vol. 24, no. 8. P. 439–354. <https://doi.org/10.1089/1079990041689665>.
8. Gattoni A., Parlato A., Vangieri B., Bresciani M., Derna R. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts) // La Clinica Terapeutica. 2006. Vol. 157, no. 4. P. 377–386.
9. Borden E., Sen G. C., Uze G., Silverman R. H., Ransohoff R. M., Foster G. R., et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine // Nature Reviews Drug Discovery. 2007. Vol. 6. P. 975–990. <https://doi.org/10.1038/nrd2422>.
10. Савенкова М. С. Циклоферон в клинической практике (обзор литературы) // Практика педиатра. 2020. N 3. С. 6–11.
11. Григорян С. С., Исаева Е. И., Бакалов В. И., Осипова Е. А., Бевз А. Ю., Простяков И. В. [и др.]. Амиксин – индукция интерферонов альфа, бета, гамма и лямбда в сыворотке крови и легочной ткани // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. 2015. Т. 23. N 2. С. 93–99.
12. Шульдяков А. А., Ляпина Е. П., Соболева Л. А., Романцов М. Г., Перминова Т. А., Кузнецов В. И. [и др.]. Использование индукторов интерферона в клинике инфекционных болезней // Антибиотики и химиотерапия. 2018. Т. 63. N 3-4. С. 28–31.
13. Мазина Н. К., Мазин П. В., Редькина Д. В. Влияние циклоферона на эффективность фармакотерапии инфекционных заболеваний широкого спектра у детей и взрослых. Систематический обзор и метаанализ // Антибиотики и химиотерапия. 2018. Т. 63. N 11-12. С. 31–35.
14. Мазина Н. К., Мазин П. В., Хафизьянова Р. Х. Клиническая эффективность циклоферона в составе комплексной терапии туберкулеза. Систематически обзор и результаты метаанализа // Антибиотики и химиотерапия. 2019. Т. 64. N 3-4. С. 15–24. <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-100013>.
15. Коломиец В. М., Абрамов А. В., Рачина Н. В., Рублева Н. В. Интенсификация этиотропной терапии больных запущенным туберкулёзом лёгких с использованием иммуномодуляторов // Антибиотики и химиотерапия. 2015. Т. 60. N 7-8. С. 18–22.
16. Коломиец В. М., Рублева Н. В. Запущенный туберкулез легких: проблемы и эффективность реабилитации // Научный результат. Серия: Медицина и фармация. 2016. Т. 2. N 1. С. 3–9. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2016-2-1-3-9>.
17. Пат. № 2429871, Российская Федерация. Препарат для лечения желудочно-кишечных болезней телят и способ его применения / В. А. Чхенкели, Н. В. Белова, Н. А. Шкиль, Г. Д. Чхенкели; заявитель и патентообладатель Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Россельхозакадемии; № 2010135450/15; заявл. 24.08.2010; опубл. 27.09.2011. Бюл. № 27. 17 с.
18. Пат. № 2545986, Российская Федерация. Препарат Траметин для лечения желудочно-

кишечных болезней телят и способ его применения / В. А. Чхенкели, С. В. Юденич, Н. А. Шкиль, Г. Д. Чхенкели, Е. Д. Романова; заявитель и патентообладатель Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Россельхозакадемии; № 2013139184/15; заявл. 22.08.2013; опубл. 10.04.2015. Бюл. № 10.

REFERENCES

1. Sharma D., Singh V. P., Singh N. K. A review on phytochemistry and pharmacology of medicinal as well as poisonous mushrooms. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2018;18(13):1095–1109. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170927144119>.
2. Chkhenkeli V. A. *Mechanisms of action of the drug Trametin on the body of animals with associated infections*. St. Petersburg: Prospekt nauki; 2020. 176 p. (In Russian)
3. Chkhenkeli V. A. *Latest generation drugs based on fungi – xylophiles of the genus Trametes: discovered effects, mechanisms of action and application*. Moscow: Pero; 2014. 256 p. (In Russian).
4. Chkhenkeli V. A., Romanova E. D., Masov B. Y. *Veterinary drug Trametin and prevention of the negative impact of environmental factors on the body*. LAP Lambert Academic Publishing RU, 2020. 121 p. (In Russian).
5. Colby C., Chamberlin M. J., Duesberg P. H., Simon M. I. The Specificity of Interferon Induction. In: Beers R. F., Braun W. (eds.). *Biological Effects of Polynucleotides: Proceedings of the Symposium on Molecular Biology*, June 4–5 1970, New York. Berlin, Heidelberg: Springer; 1971, p. 79–87. https://doi.org/10.1007/978-3-642-85772-0_7.
6. Vakhitov H. M., Pikuza O. I., Vakhitova L. F., Zakirova A. M., Rizvanova F. F. Interferon inducers in prevention and treatment of respiratory infections in children. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii = Russian Bulletin of perinatology and pediatrics*. 2019;64(3):103–108. (In Russian). <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2019-64-3-103-108>.
7. Malmgaard L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2004;24(8):439–354. <https://doi.org/10.1089/1079990041689665>.
8. Gattoni A., Parlato A., Vangieri B., Bresciani M., Derna R. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts). *La Clinica Terapeutica*. 2006;157(4):377–386.
9. Borden E., Sen G. C., Uze G., Silverman R. H., Ransohoff R. M., Foster G. R., et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007;6:975–990. <https://doi.org/10.1038/nrd2422>.
10. Savenkova M. S. Cycloferon in clinical practice (literature review). *Praktika pediatria*. 2020;3:6–11. (In Russian).
11. Grigoryan S. S., Isaeva E. I., Bakalov V. I., Osipova E. A., Bezz A. Yu., Prostakov I. V., et al.
12. Simonyan G. A., Hismutdinov F. F. *Veterinary hematology*. M.: Kolos, 1995. 256 p.
13. Dudnikov S. A. *Quantitative epizootology: foundations of applied epidemiology and biostatistics*. Vladimir: Demurg, 2004. 460 p.
14. Amiksin – induction of interferons alpha, beta, gamma and lambda in blood serum and lung tissue. *Russkii meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*. 2015;23(2):93–99. (In Russian).
15. Shuldyakov A. A., Lyapina E. P., Soboleva L. A., Romantsov M. G., Perminova T. A., Kuznetsov V. I., et al. The use of interferon inducers in an infectious disease clinic. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2018;63(3-4):28–36. (In Russian).
16. Mazina N. K., Mazin P. V., Redkina D. V. The influence of cycloferon on the effectiveness of pharmacotherapy of wide spectrum of infectious diseases in children and adults: systematic review and meta-analysis. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2018;63(11-12):31–35. (In Russian).
17. Mazina N. K., Mazin P. V., Khafizyanova R. K. Clinical Efficacy of Cycloferon in The Complex Therapy of Tuberculosis: Systematic Review and Meta-Analysis Results. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2019;64(3-4):15–24. (In Russian). <https://doi.org/10.24411/0235-2990-2019-100013>.
18. Kolomiets V. M., Abramov A. V., Rachina N. V., Rubleva N. V. Immunomodulator Intensification of Etiotropic Therapy in Patients with Advanced Pulmonary Tuberculosis. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2015;60(7-8):18–22. (In Russian).
19. Kolomiets V. M., Rubleva N. V. Launched lung tuberculosis: problems and efficiency of rehabilitation. *Nauchnyi rezul'tat. Seriya: Meditsina i farmatsiya = Research result. Medicine and Pharmacy Series*. 2016;2(1):3-9. (In Russian). <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2016-2-1-3-9>.
20. Chkhenkeli V. A., Belova N. V., Shkil' N. A., Chkhenkeli G. D. *Preparation to treat gastrointestinal diseases of calves and method of its application*. Patent RF, no. 2429871; 2010. (In Russian).
21. Chkhenkeli V. A., Yudenich S. V., Shkil' N. A., Chkhenkeli G. D., Romanova E. D. *Trametin preparation for the treatment of gastrointestinal diseases in calves and method of its use*. Patent RF, no. 2545986; 2013. (In Russian).
22. Simonyan G. A., Khismutdinov F. F. *Veterinary hematology*. Moscow: Kolos; 1995. 256 p. (In Russian).
23. Dudnikov S. A. *Quantitative Epizootology: Foundations of Applied Epidemiology and Biostatistics*. Vladimir: Demurg; 2004; 460 p. (In Russian).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Чхенкели Вера Александровна,
д.б.н., доцент,
ведущий научный сотрудник,
НИИ биологии,
Иркутский государственный университет,
664011, г. Иркутск, ул. Ленина, 3,
Российская Федерация,
chkhenkeli@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0001-815-2623>

Вклад автора

Чхенкели В. А. 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.

Информация о статье

*Поступила в редакцию 22.10.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Vera A. Chkhenkeli,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor,
Leading Researcher,
Research Institute of Biology,
Irkutsk State University,
3, Lenin St., Irkutsk, 664011,
Russian Federation,
chkhenkeli@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0001-815-2623>

Contribution of the author

Vera A. Chkhenkeli 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.

Information about the article

*The article was submitted 22.10.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.*

Научная статья

УДК 664.864

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-590-602>



Изучение антиоксидантных свойств лекарственных растений и их влияние на микробную порчу полуфабрикатов мяса, птицы и рыбы

Наталья Борисовна Еремеева*, Надежда Викторовна Макарова**

*Университет ИТМО, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Самарский государственный технический университет, г. Самара, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Еремеева Наталья Борисовна, eremeeva.itmo@gmail.com

Аннотация. Растительные экстракты, богатые полифенолами, могут использоваться в пищевой промышленности в качестве натуральных консервантов и значительно уменьшить использование химических консервантов, продлевая срок годности готовых продуктов и полуфабрикатов. Цель данного исследования – изучение полифенольного состава экстрактов лекарственных растений, их антиоксидантной активности и антибактериальных свойств в условиях пищевых систем. Объекты исследования: горец птичий (*Polýgonum aviculáre*), душица (*Origanum*), череда (*Bídenstripartita*), чабрец (*Thýmus*), брусника листья (*Vaccíniumvítis-idaéa*), календула цветки (*Calendula*), шалфей (*Salvia*), ромашка цветки (*Matricāriachatomílla*), эвкалипт (*Eucalýptus*), толокнянка (*Arctostáphylosúva-úrsi*). Определены: общее содержание фенольных соединений, флавоноидов; антиоксидантная активность по методу DPPH и FRAP; изменение обсемененности животного сырья на ОМЧ, БГКП, дрожжи/грибы, сальмонеллы, стафилококки. Экстракты шалфея (1138 ± 57 мг ГК/100 г и 537 ± 25 мг К/100 г), эвкалипта (1073 ± 49 мг ГК/100 г и 412 ± 20 мг К/100 г), цветков ромашки (1002 ± 36 мг ГК/100 г и 493 ± 22 мг К/100 г) и душицы (1015 ± 42 мг ГК/100 г и 458 ± 21 мг К/100 г) содержат наибольшее количество биологически активных веществ (фенольных веществ и флавоноидов соответственно). Экстракты шалфея, эвкалипта и ромашки проявляют наибольшую активность среди исследуемых объектов по показателям антиоксидантности. Большинство анализируемых экстрактов не влияет или влияет в незначительной степени на органолептические свойства готовых продуктов. Полное подавление роста патогенных микроорганизмов в пищевых системах при исследуемых условиях проявляют также экстракты цветков ромашки, шалфея и эвкалипта. Значительное сокращение роста микрофлоры происходит при обработке животного сырья экстрактами цветков календулы, душицы, чабреца. Экстракты шалфея, цветков ромашки, цветков календулы, душицы, чабреца могут быть рекомендованы в качестве компонентов пищевого сырья.

Ключевые слова: экстракты лекарственных растений, антиоксидантная активность, антибактериальная активность, микробиологическая порча

Для цитирования: Еремеева Н. Б., Макарова Н. В. Изучение антиоксидантных свойств лекарственных растений и их влияние на микробную порчу полуфабрикатов мяса, птицы и рыбы // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 590–602. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-590-602>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Antioxidant properties of medicinal plants and their effect on microbial spoilage of semi-finished meat, poultry and fish

Natalya B. Eremeeva*, Nadezhda V. Makarova**

*ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation

**Samara State Technical University, Samara, Russian Federation

Corresponding author: Natalya B. Eremeeva, eremeeva.itmo@gmail.com

Abstract. Plant extracts rich in polyphenols can be used in the food industry as natural preservatives, extending the shelf life of prepared and semi-finished foods without chemical preservatives. In this paper, we investigate the polyphenolic composition, antioxidant activity and antibacterial properties of herbal extracts as part of food systems. The research objects were knot grass (*Polýgonum aviculáre*), marjoram (*Origanum*), bur beggar-ticks (*Bidenstripartita*), thyme (*Thymus*), whortleberry leaves (*Vaccínium ida vítis*), calendula (*Calendula*), sage (*Salvia*), chamomile flowers (*Matricáriachamomilla*), eucalyptus (*Eucalýptus*) and bearberry (*Arctostáphylosúva-úrsi*). We determined the total content of phenolic compounds and flavonoids; the antioxidant activity by DPPH and FRAP methods; variations in the bacterial contamination of animal raw materials over total bacterial count (TBC), coliform bacteria, yeast/fungi, salmonella and staphylococcus. Extracts of sage (1138±57 mg GA/100 g and 537±25 mg C/100 g), eucalyptus (1073±49 mg GA/100 g and 412±20 mg C/100 g), chamomile flowers (1002±36 mg GA/100 g and 493±22 mg C/100 g) and marjoram (1015±42 mg GA/100 g and 458±21 mg C/100 g) contain the largest amount of biologically active substances (phenols and flavonoids, respectively). Sage, eucalyptus and chamomile extracts demonstrate the highest antioxidant activity among the studied samples. Most of the studied extracts exhibit little or no effect on the organoleptic properties of finished products. In addition, chamomile flower, sage and eucalyptus extracts suppress the growth of pathogenic microorganisms in foods under experimental conditions. The microflora growth is significantly reduced when treating animal raw materials with calendula flowers, marjoram and thyme extracts. Extracts of sage, chamomile flowers, calendula flowers, marjoram and thyme can be recommended as components of food raw materials.

Keywords: herbal extracts, antioxidant activity, antibacterial activity, microbial spoilage

For citation: Eremeeva N. B., Makarova N. V. Antioxidant properties of medicinal plants and their effect on microbial spoilage of semi-finished meat, poultry and fish. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotehnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):590-602. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-590-602>.

ВВЕДЕНИЕ

Невосприимчивость грамотрицательных бактерий к воздействию различных веществ с каждым годом возрастает. Распространение бактерий с множественной резистентностью к лекарствам стимулирует поиск новых антибактериальных препаратов для борьбы с устойчивыми фенотипами [1, 2]. Растительные вещества являются хорошим источником противоинфекционных соединений благодаря разнообразию их видов и, соответственно, химических структур [3].

Лекарственные растения играют важную роль в развитии современных исследований, являясь отправной точкой для новых разработок в медицине [4]. Растительные материалы по-прежнему незаменимы при оказании первичной медико-санитарной помощи в качестве терапевтических средств. Известно, что лекарственные растения лечат многие инфекционные заболевания, и это обосновывает их использование в качестве источника антимикробных агентов для расширения спектра доступных антибиотиков [5]. Большинство из них содержат вещества, являющиеся предшественниками для синтеза лекарств, или вещества, которые могут быть использованы в терапевтических целях. Экстракты, подтвердившие свою эффективность, могут быть использованы в качестве естественных альтернативных профилактических средств для борьбы с заболеваниями, вызванными пищевыми отравлениями. Это позволит сохранять пищевые продукты без опасности для здоровья человека от воздействия химически полученных антимикробных агентов [6]. Растения используются в меди-

цине в различных странах и являются источником многих сильнодействующих биологически активных веществ. Использование растения полностью или его отдельных частей, содержащих разнообразные по составу и количеству биологически активные компоненты, позволяет целенаправленно действовать против различных патогенов [7].

В некоторых публикациях сообщается, что продукты из куриного мяса могут содержать патогены пищевого происхождения и бактерии порчи, сокращающие срок годности, вызывая опасность для здоровья потребителей [8, 9]. В частности, существует высокий риск пищевого отравления при употреблении готовых продуктов типа Street food, что обусловлено быстрым способом приготовления, недостаточным для уничтожения микробов, или загрязнением во время хранения [10, 11]. В готовых изделиях могут присутствовать такие патогены, как *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 и *Salmonella* spp. [12].

Специи и травы применяются для маринада мяса, действуя как хорошие натуральные консерванты. Авторами работы [13] было показано, что имбирная паста обладает сильной антимикробной активностью в отношении *E. coli* O157:H7, вызывая ингибирование патогенных бактерий в 2 раза в говяжьем фарше через 3 дня при температуре 8 °C. В другом исследовании авторы продемонстрировали низкий рост микробов в сухом вяленом мясе, обработанном ферментированной соевой пастой, – 3,30 Log₁₀ КОЕ г че-

рез 48 ч хранения при температуре 37 °С [14].

Растительные экстракты содержат широкий спектр биологически активных соединений: в основном полифенолы, а также иридоиды, амиды, алкалоиды, сапонины, гликозиды и терпеноиды [15]. Полифенолы встречаются во всех частях растений, но их наибольшее количество было обнаружено в листьях [16]. Растительные экстракты проявляют высокую антибактериальную активность, что подтверждается некоторыми последними исследованиями. Экстракт гибискуса сабдариффа (*Hibiscus sabdariffa*) показал антибактериальную активность в отношении грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) и грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*) [17]. Экстракты, полученные из таких лекарственных растений, как *Agrimonia pilosa*, *Smilax glabra*, *Iris domestica*, *Anemone chinensis*, подавляли рост патогенов пищевого происхождения: *S. enterica* Ty-phimurium, *E. coli* и *L. monocytogenes* [18].

Существует три основных механизма действия полифенолов:

- а) ингибирование функции цитоплазматической мембраны;
- б) ингибирование синтеза нуклеиновых кислот;
- в) ингибирование энергетического метаболизма.

Полифенолы могут изменять морфологию клеток бактерий, повреждая клеточную стенку, что приводит к «утечке» («leakage») внутриклеточного материала. Они способны увеличить выработку активных форм кислорода (АФК) и, следовательно, вызвать окислительный стресс в клетках бактерий. Они также могут влиять на биосинтез белка, что приводит к изменениям в метаболических процессах. При более высоких концентрациях полифенолы могут оказывать ингибирующее действие, при более низких – стимулирующее действие, что свидетельствует о механизме бактериальной защиты [19, 20].

Благодаря своим антибактериальным и антиоксидантным свойствам растительные экстракты, богатые полифенолами, могут использоваться в пищевой промышленности в качестве натуральных консервантов, что значительно уменьшит применение химических консервантов. Они способны продлить срок годности готовых продуктов и полуфабрикатов, подавляя рост бактерий и тем самым замедляя процессы порчи.

Целью данной работы являлось изучение полифенольного состава экстрактов таких лекарственных растений, как горец птичий, душица, череда, чабрец, брусника листья, календулы цветки, шалфей, ромашка цветки, эвкалипт, толокнянка, их антиоксидантной активности и антибактериальных свойств в условиях пищевых систем.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Химические вещества и реагенты. Этанол, дистиллированная вода. Реактив Фолина – Чокальтеу и галловая кислота были приобретены у фирмы Fluka (Германия), DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), нитрит натрия, хлорид алюминия, карбонат натрия, линолевая кислота – у фирмы Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Германия), 2,4,6-три(2-пиридил)-s-триазин (TPTZ) – у фирмы Fluka Chemicals (Испания). В исследовании также использованы соляная и уксусная кислоты, ацетат натрия, фосфат натрия, хлорид железа (II), хлорид железа (III), хлорид калия, роданид аммония.

Объекты исследования. Экстракты получены из лекарственных растений: горец птичий (*Polygonum aviculare*), душица (*Origanum*), череда (*Bidens tripartita*), чабрец (*Thymus*), брусника листья (*Vaccinium vitis-idaea*), календула цветки (*Calendula*), шалфей (*Salvia*), ромашка цветки (*Matricaria chamomilla*), эвкалипт (*Eucalyptus*), толокнянка (*Arctostaphylos uva-ursi*). Влияние антибактериальной активности экстрактов определялось на мясе свиньи (гуляш свиной охлажденный, «Слово мясника»), мясе курицы (филе цыпленка-бройлера охлажденное, «Пестречинка № 3») и рыбе (треска мурманская, свежемороженая, филе, «Бухта избобилия»).

Получение экстракта. Концентрированные экстракты получены при следующих технологических параметрах: экстрагирование 505-ным этиловым спиртом при температуре 40±5 °С в течение 120 мин, соотношении сырье/растворитель 1:10. Концентрирование происходило на циркуляционном вакуум-выпарном аппарате до содержания массовой доли растворимых сухих веществ 30%.

Обработка мяса экстрактами. Образцы свинины, курицы и рыбы обрабатывали концентрированными экстрактами в количестве 5% по массе. Образцы хранили в течение 3, 6 и 9 дней при температуре 3–7 °С без доступа света и кислорода.

Определение органолептических показателей образцов свинины с экстрактами проводили по ГОСТ 9959-2015, курицы с экстрактами – по ГОСТ 31936-2012, рыбы с экстрактами – по ГОСТ 7631-2008.

Содержание общих фенолов в объектах оценивали с помощью модифицированной версии метода Фолина – Чокальтеу [21]. Галловую кислоту использовали в качестве стандарта, водный раствор галловой кислоты (200 мг в 1000 см³) разбавляли дистиллированной водой, чтобы получить соответствующие концентрации для калибровочной кривой. Для анализа было взято 0,50 см³ анализируемого объекта или стандарта галловой кислоты, 4,00 см³ дистиллированной воды, 0,25 см³ реактива Фолин – Чокальтеу и 0,25 см³ насыщенного водного раствора карбоната натрия. Образцы встряхивали и выдержи-

вали в темноте 30 мин при комнатной температуре. Коэффициент поглощения определяли на спектрофотометре при 725 нм. Результаты выражали в мг эквивалента галловой кислоты в 100 г сухого веса. Эксперимент проводился в трехкратном повторении.

Общее содержание флавоноидов в объектах измеряли с использованием модифицированного метода, изложенного в работе [21]. Анализируемый объект или стандартный раствор катехина в объеме 0,50 см³ добавляли в мерную пробирку объемом 10 см³. Затем добавляли 2,50 см³ дистиллированной воды, в нулевой момент времени добавляли 0,15 см³ 5%-го раствора нитрита натрия, через 5 мин добавили 0,30 см³ 10%-го раствора хлорида алюминия и выдержали еще 5 мин. Коэффициент поглощения измеряли при 510 нм. Содержание флавоноидов выражали в мг эквивалентов катехина в 100 г сухого веса. Эксперимент проводился в трехкратном повторении.

Антиоксидантная активность образцов определяли по методу DPPH [21], основанному на способности антиоксидантов исходного сырья связывать стабильный хромоген-радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH). DPPH (4 мг) растворяли в 100 см³ этанола. Аликвоты исследуемого объекта (0,05; 0,10; 0,40; 0,80; 1,00 и 5,00 см³) растворяли в 100 см³ дистиллированной воды. Затем 0,2 см³ каждого раствора добавляли к 2,0 см³ раствора DPPH при 20 °С и выдерживали в темноте в течение 30 мин. Коэффициент пропускания определяли при 517 нм. Антирадикальную активность выражали в виде концентрации исходного объекта в мг/см³, при которой происходило связывание 50% радикалов. Эксперимент проводился в трехкратном повторении.

Восстанавливающую силу исследуемого объекта определяли методом FRAP [21]. Для анализа использовали свежеприготовленный раствор FRAP: смешивали 10 см³ ацетатного буфера (pH = 3,6), 1 см³ 10 %-го раствора хлорида железа (III) и 1 см³ раствора TPTZ (2,4,6-трипиридил-s-триазина) (10 ммоль/л TPTZ в 40 ммоль/1000 см³ HCl), выдерживали 10 мин при температуре 37 °С. К анализируемому объекту (0,1 см³) добавляли 3,0 см³ дистиллированной воды и 1 см³ раствора FRAP. Смесь выдержали в течение 4 мин при температуре 37 °С. Оптическую плотность измеряли при 593 нм. Восстанавливающую силу определяли по калибровочному графику и выражали в ммоль Fe²⁺/1 кг исходного сырья. Эксперимент проводился в трехкратном повторении.

Микробиологический анализ. С помощью микробиологических экспресс-тестов «Петри-тест» определяли общее микробное число (ОМЧ), общую бактериальную обсемененность (КМАФАнМ количество мезофильных аэробных и

факультативно анаэробных микроорганизмов), количество бактерий группы кишечных палочек (БГКП), а также число колониеобразующих единиц сальмонелл и стафилококка. Для этих целей термостатирование проводили при температуре 37 °С, результаты получали через 24 ч.

Для теста на дрожжи/грибы термостатирование не требовалось, результаты получали через 72 ч. Плотность выросших на Петритесте дрожжей и грибов сравнивали с приведенным в методике рисунком.

Статистическая обработка данных производилась путем расчета среднего (М) и стандартного отклонения (М±m) с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Концентрированные экстракты лекарственных растений получены по разработанной нами ранее технологии [22]. Предварительно определен химический состав экстрактов и содержание биологически активных веществ и их активность.

Результаты исследования показали, что содержания фенольных веществ зависит от вида растительного сырья (рис. 1). Наибольшее количество содержится в экстрактах шалфея и эвкалипта – 1138±57 и 1073±49 мг ГК/100 г соответственно. Также значительное количество фенольных соединений содержится в экстрактах ромашки (1002±36 мг ГК/100 г), душицы (1015±42 мг ГК/100 г) и чабреца (1011±39 мг ГК/100 г). Наименьшее количество фенольных веществ среди исследуемых образцов обнаружено в экстрактах череды (713±31 мг ГК/100 г) и цветков календулы (809±33 мг ГК/100 г).

Флавоноиды представляют собой разнообразность фенольных соединений с широким спектром биологической активности. Было установлено, что в экстрактах шалфея (537±25 мг К/100 г), цветков ромашки (493±22 мг К/100 г), душицы (458±21 мг К/100 г) и эвкалипта (412±20 мг К/100 г) содержится максимальное среди исследуемых объектов количество флавоноидов (см. рис. 1). Минимальное их количество обнаружено в экстрактах горца птичьего (211±11 мг К/100 г) и цветков календулы (175±10 мг К/100 г). Эти показатели коррелируются с содержанием фенольных веществ в объектах.

Результаты, полученные методами DPPH и FRAP, подтвердили наличие антиоксидантной активности у экстрактов лекарственных растений. Наивысшую активность по обоим показателям проявили экстракты шалфея, эвкалипта, ромашки и горца птичьего, что видно из диаграммы, представленной на рис. 2. Это связано с содержанием в их химическом составе биологически активных веществ, в том числе фенольных соединений и флавоноидов.

Влияние добавления экстрактов из лекарственных трав на органолептические свойства

свинины, курицы и рыбы изучены после термической обработки следующими технологическими способами: запекание при 180 °С, варка в воде и жарка в масле. Оценку органолептических свойств животного сырья осуществляли по 5-балльной шкале в зависимости от растительного экстракта и способа тепловой обработки (табл. 1–3).

Добавление экстрактов большинства растений (череда, календулы цветки, чабрец, толокнянка) не влияет на органолептические свойства готовых продуктов. Экстракты некоторых растений (брусника листья, горец птичий, ромашка цветки) влияют в незначительной степени, при

этом экстракты душицы и шалфея придают продуктам малоощутимый травянистый аромат и вкус. Экстракт эвкалипта имеет специфические вкусо-ароматические свойства, что негативно сказывается на органолептических характеристиках блюд, в которых он присутствует. Следует отметить, что на яркость вкуса и аромата продуктов, приготовленных из мяса, курицы и рыбы, оказывают влияние не только добавляемые растительные экстракты, но и способ тепловой обработки животного сырья: они наиболее выражены при жарке, а наименее – при варке.

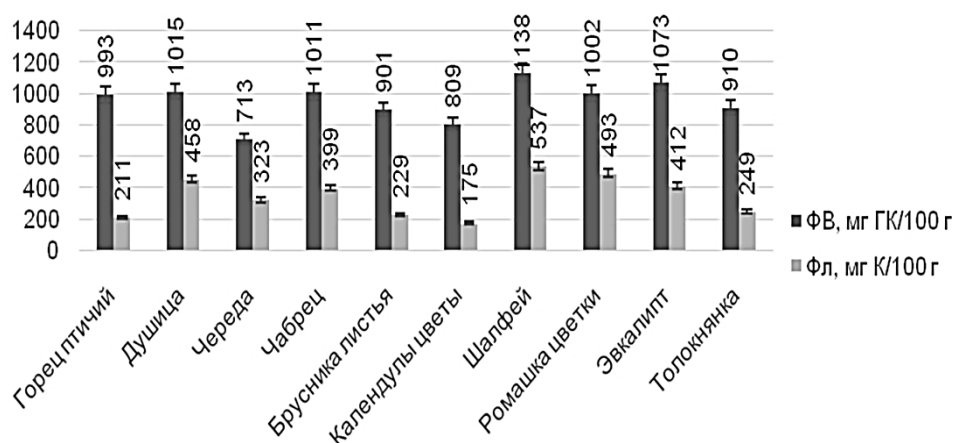


Рис. 1. Содержание фенольных веществ (ФВ) и флавоноидов (Фл) в экстрактах лекарственных растений:
 ФВ, мг ГК/100 г – фенольные вещества, мг галловой кислоты в 100 г сухого веса;
 Фл, мг К/100 г – флавоноиды, мг катехина в 100 г сухого веса

Fig. 1. Content of phenolic substances (PV) and flavonoids (FI) in herbal extracts:
 EF, mg HA / 100 g – phenolic substances, mg gallic acid per 100 g of dry weight;
 FI, mg K / 100 g – flavonoids, mg catechin per 100 g of dry weight

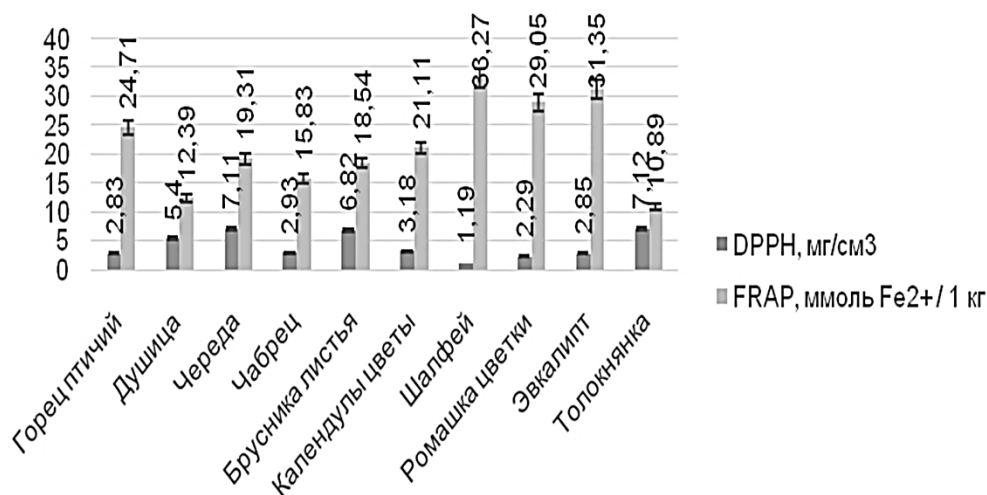


Рис. 2. Антиоксидантная активность экстрактов лекарственных растений:
 DPPH – концентрации исходного объекта в мг/см³, при которой происходило связывание 50% радикалов;
 FRAP – восстанавливающую силу определяли по калибровочному графику и выражали в ммоль Fe²⁺/1 кг исходного сырья

Fig. 2. Antioxidant activity of herbal extracts:
 DPPH – concentration of the parent object in mg / cm³ at which the half-binding of radicals took place;
 FRAP – reducing force was determined from the calibration graph and expressed in mmol Fe²⁺ / 1 kg of feedstock

Таблица 1. Органолептические профили комбинации мяса свинины и растительных экстрактов в зависимости от способа тепловой обработки
Таблица 1. Organoleptic profiles of pork and plant extracts combination depending on the cooking method

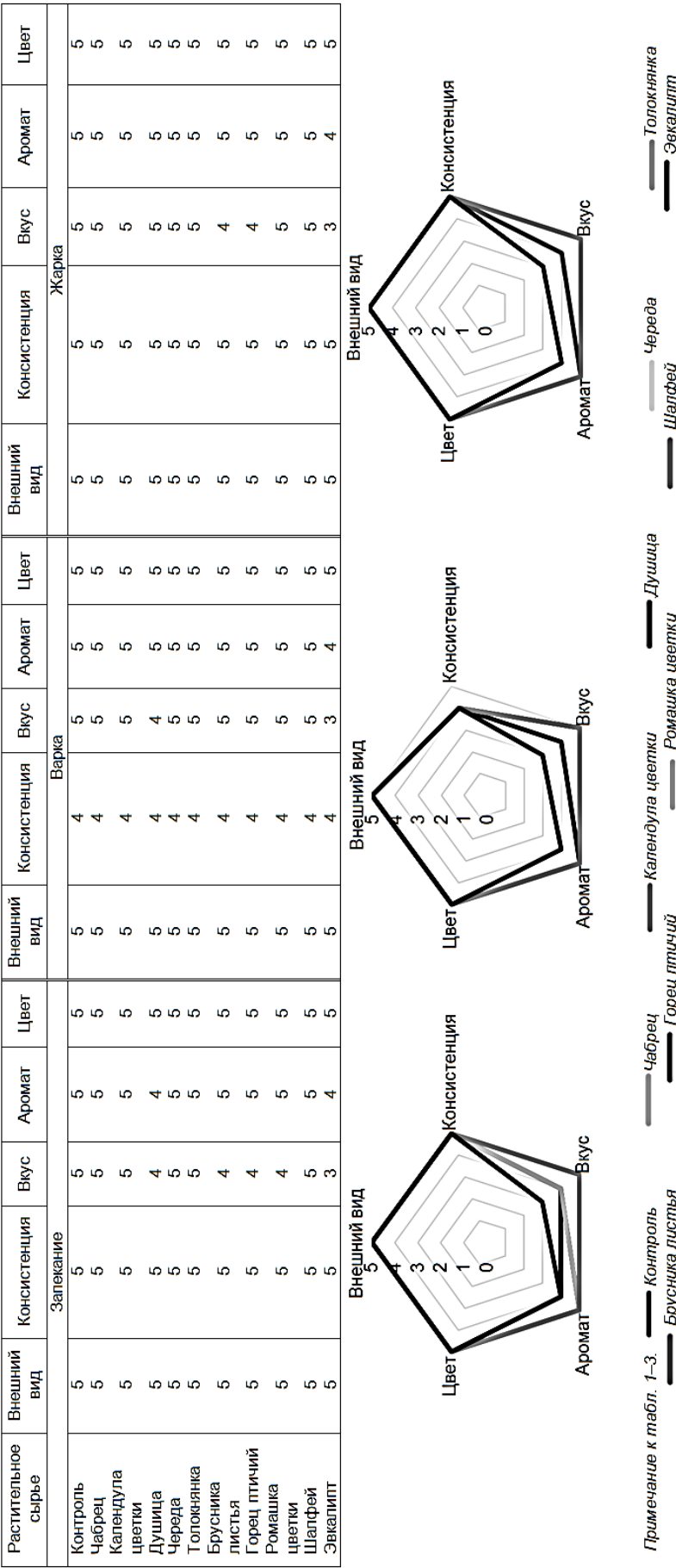


Таблица 2. Органолептические профили комбинации мяса птицы и растительных экстрактов в зависимости от способа тепловой обработки
 Таблица 2. Organoleptic profiles of poultry and plant extracts combination depending on the cooking method

Растительное сырье	Внешний вид	Запекание				Варка				Жарка					
		Консистенция	Вкус	Аромат	Цвет	Внешний вид	Консистенция	Вкус	Аромат	Цвет	Внешний вид	Консистенция	Вкус	Аромат	Цвет
Контроль	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5
Чабрец	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5
Календула	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5
цветки	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5
Душица	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5
Черёда	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5
Толокнянка	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5
Брусника	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5
листья	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5
Горец птичий	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5
Ромашка	5	5	4	4	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5
цветки	5	5	4	4	5	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5
Шалфей	5	5	4	4	5	5	5	4	4	5	5	4	4	4	5
Эвкалипт	5	5	3	3	4	5	5	3	4	5	5	4	3	4	5

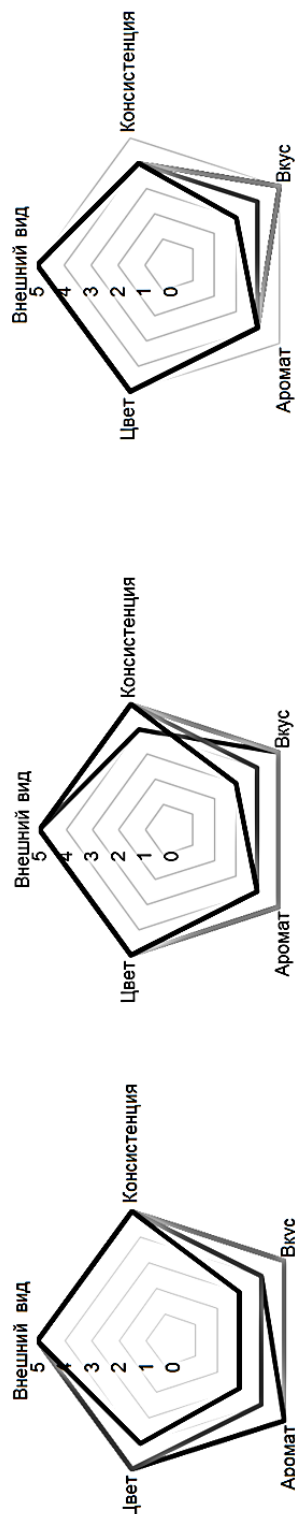


Таблица 3. Органолептические профили комбинации рыбы и растительных экстрактов в зависимости от способа тепловой обработки

Таблица 3. Organoleptic profiles of fish and plant extracts combination depending on the cooking method

Растительное сырье	Запекание					Варка					Жарка				
	Внешний вид	Консистенция	Вкус	Аромат	Цвет	Внешний вид	Консистенция	Вкус	Аромат	Цвет	Внешний вид	Консистенция	Вкус	Аромат	Цвет
Контроль	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Чабрец	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Календула	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
цветки	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Душица	5	5	3	5	5	4	5	4	5	5	5	5	4	5	5
Черёда	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Толокнянка	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Брусника	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
листья	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Горец птичий	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Ромашка	5	5	3	4	5	4	5	4	5	5	5	5	4	5	5
цветки	5	5	4	4	5	4	5	4	4	5	5	5	4	4	5
Шалфей	5	5	3	3	5	4	5	3	3	5	5	5	3	3	5
Эвкалипт	5	5	3	3	5	4	5	3	3	5	5	5	3	3	5

Внешний вид

5

4

3

2

1

0

Цвет

Консистенция

Вкус

Аромат

Внешний вид

5

4

3

2

1

0

Цвет

Консистенция

Вкус

Аромат

Внешний вид

6

5

4

3

2

1

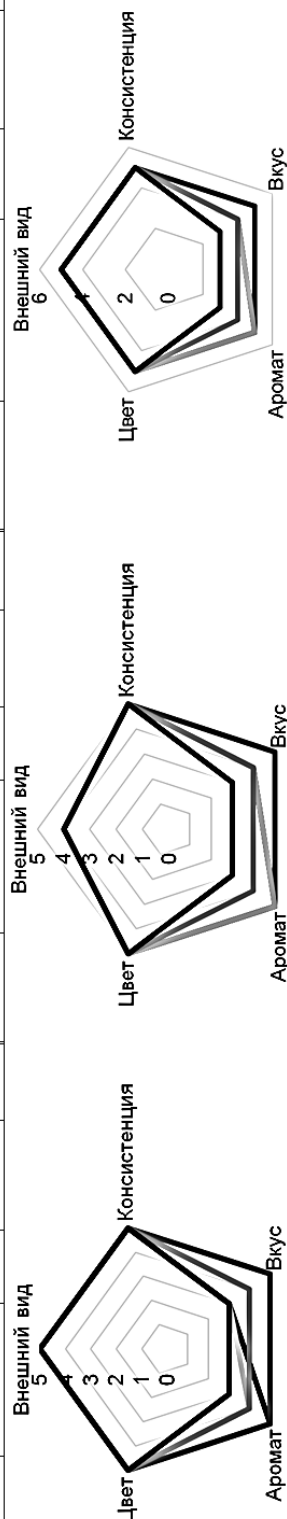
0

Цвет

Консистенция

Вкус

Аромат



На основании органолептических профилей определены комбинации животного сырья и растительных экстрактов.

Проведены исследования влияния растительного экстракта на микробиологическую порчу мяса, птицы и рыбы. Образцы животного сырья нарезали на куски 1×1 см и обработали концентрированным экстрактом лекарственных растений в количестве 5% масс. Обработанные образцы хранили при 4–5 °С в течение 3, 6 и 9 дней, после чего определяли показатели содержания ОМЧ, БГКП, дрожжей/грибов; сальмонеллы и стафилококка. В качестве контрольного образца использовали животное сырье без обработки растительными экстрактами.

Контрольный образец мяса с течением времени изменял свои показатели качества: на шестой день уровень содержания БГКП повысился до 10^2 КОЕ/г, а на девятый день – до 10^3 КОЕ/г, что соответствует большой микробиологической загрязненности. Аналогично повышалось содержание сальмонеллы и стафилококка, а общее микробное число увеличилось до 10^2 КОЕ/г на третий день, до 10^3 КОЕ/г – на шестой день, до 10^5 КОЕ/г – на девятый. Использование экстракта горца птичьего не привело к уменьшению роста патогенной микрофлоры, при этом наблюдалась аналогичная картина увеличения обсемененности образца с течением времени, как и в случае контрольного образца. Экстракт цветков календулы и экстракт толокнянки способны снизить содержание БГКП, ОМЧ, сальмонеллы и

стафилококка в мясе на порядок по сравнению с контрольным образцом, однако, на девятый день наблюдалось увеличение вышеперечисленных показателей до небольшого количества. ОМЧ для образцов мяса с экстрактом толокнянки увеличилось до 10^2 КОЕ/г на шестой день и до 10^3 КОЕ/г – на девятый. Наибольший интерес представил образец мяса с экстрактом цветков ромашки: все исследуемые показатели оставались в норме в течение девяти дней, микробиологической обсемененности не произошло. В связи с этим данный экстракт может быть рекомендован в качестве антимикробного агента для пищевых продуктов. Результаты представлены в табл. 4.

В случае хранения контрольных образцов птицы наблюдается аналогичная картина: с течением времени происходит ухудшение показателей микробиологической чистоты с пиком на девятый день исследования. Также в контрольном образце в заключительный день были обнаружены дрожжи/грибы. Применение экстрактов лекарственных трав в рецептурах полуфабрикатов приводит к подавлению роста патогенной микрофлоры. Так, в образцах птицы с экстрактом душицы небольшое количество БГКП, стафилококка и сальмонеллы (10^3 КОЕ/г) обнаружено лишь на девятый день исследования. Образцы птицы с экстрактом шалфея и экстрактом эвкалипта оказались микробиологически чистыми на протяжении всего периода эксперимента. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 4. Влияние экстрактов лекарственных трав на микробиологическую порчу свинины

Table 4. Influence of herbal extracts on microbiological spoilage of pork

Объект исследования (животное сырье + + экстракт)	Продолжительность хранения образцов, дней	Содержание, КОЕ/г				
		БГКП	Дрожжи / грибы	ОМЧ	Сальмонелла	Стафилококк
Контроль	0	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	3	10^1	10^1	10^2	10^1	10^1
	6	10^2	10^1	10^3	10^2	10^2
	9	10^3	10^1	10^5	10^3	10^3
Горец птичий	0	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	3	10^1	10^1	10^2	10^1	10^1
	6	10^2	10^1	10^3	10^2	10^2
	9	10^3	10^1	10^5	10^3	10^3
Календулы цветки	0	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	3	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	6	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	9	10^2	10^1	10^2	10^2	10^2
Ромашка цветки	0	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	3	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	6	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	9	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
Толокнянка	0	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	3	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	6	10^1	10^1	10^2	10^1	10^1
	9	10^2	10^1	10^3	10^2	10^2

Примечание к табл. 4–6. 10^1 – колония микроорганизмов отсутствует, 10^2 – колония небольшая, 10^3 – 10^5 – колония большая, 10^6 – 10^7 – колония очень большая.

При хранении контрольных образцов рыбы также наблюдалось постепенное увеличение обсемененности по изучаемым показателям с пиком на девятый день. Наибольший эффект наблюдался при обработке рыбы экстрактом чабреца: выявлен рост БГКП, сальмонеллы и стафилококка до 10^2 КОЕ/г на девятый день и общего микробного числа до 10^2 КОЕ/г на шестой и

девятый день. Экстракт листьев брусники проявил активность лишь по отношению к сальмонелле, уменьшая ее рост с 10^3 КОЕ/г до 10^2 КОЕ/г на шестой день и с 10^5 КОЕ/г до 10^2 КОЕ/г – на девятый. Экстракт череды не вызвал подавления роста патогенной микрофлоры, но и не увеличил его по сравнению с контрольным образцом (табл. 6).

Таблица 5. Влияние экстрактов лекарственных трав на микробиологическую порчу мяса птицы

Table 5. Influence of herbal extracts on microbiological spoilage of poultry meat

Объект исследования (животное сырье + + экстракт)	Продолжительность хранения образцов, дней	Содержание, КОЕ/г				
		БГКП	Дрожжи / грибы	ОМЧ	Сальмонелла	Стафилококк
Контроль	0	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	3	10^1	10^1	10^2	10^1	10^1
	6	10^2	10^1	10^3	10^2	10^2
	9	10^3	10^2	10^5	10^3	10^3
Душица	0	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	3	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	6	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	9	10^2	10^1	10^1	10^3	10^2
Шалфей	0	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	3	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	6	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	9	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
Эвкалипт	0	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	3	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	6	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	9	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1

Таблица 6. Влияние экстрактов лекарственных трав на микробиологическую порчу рыбы

Table 6. Influence of herbal extracts on microbiological spoilage of fish

Объект исследования (животное сырье + + экстракт)	Продолжительность хранения образцов, дней	Содержание, КОЕ/г				
		БГКП	Дрожжи / грибы	ОМЧ	Сальмонелла	Стафилококк
Контроль	0	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	3	10^1	10^1	10^2	10^1	10^1
	6	10^3	10^1	10^3	10^2	10^2
	9	10^4	10^2	10^5	10^3	10^3
Черёда	0	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	3	10^1	10^1	10^2	10^1	10^1
	6	10^3	10^1	10^3	10^2	10^2
	9	10^4	10^2	10^5	10^3	10^3
Чабрец	0	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	3	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	6	10^1	10^1	10^2	10^1	10^2
	9	10^2	10^1	10^2	10^2	10^2
Брусника листья	0	10^1	10^1	10^1	10^1	10^1
	3	10^1	10^1	10^2	10^1	10^1
	6	10^3	10^1	10^2	10^2	10^2
	9	10^3	10^1	10^2	10^2	10^2

ВЫВОДЫ

Таким образом, в ходе исследования установлено:

– наибольшее количество биологически активных веществ – фенольных веществ и флавоноидов соответственно, содержат экстракты: шалфея – 1138 ± 57 мг ГК/100 г и 537 ± 25 мг К/100 г; эвкалипта – 1073 ± 49 мг ГК/100 г и 412 ± 20 мг К/100 г; цветков ромашки – 1002 ± 36 мг ГК/100 г и 493 ± 22 мг К/100 г; душицы – 1015 ± 42 мг ГК/100 г и 458 ± 21 мг

К/100 г. Также экстракты шалфея, эвкалипта и ромашки проявляют наибольшую активность среди исследуемых объектов по показателям антиоксидантной активности по методам DPPH и FRAP;

– большинство анализируемых экстрактов не влияют или влияют в незначительной степени на органолептические свойства готовых продуктов. Поскольку экстракт эвкалипта имеет ярко-выраженные вкусо-ароматические свойства, приводящие к негативному изменению вкуса блюд, в

которых он присутствует, его использование в качестве компонента пищевых продуктов нежелательно;

– полное подавление роста патогенных микроорганизмов в пищевых системах при исследуемых условиях проявляют также экстракты цветков ромашки, шалфея и эвкалипта. Однако экстракт эвкалипта из-за искажения вкусовых

свойств мяса, птицы и рыбы при выбранных условиях не может применяться в качестве антибактериального агента;

– значительное сокращение роста микрофлоры происходит при обработке животного сырья экстрактами цветков календулы, душицы, чабреца.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Pallett A., Hand K. Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010. Vol. 65, no. 3. P. iii25–iii33. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq298>.
2. Tchinda C. F., Voukeng I. K., Beng V. P., Kuete V. Antibacterial activities of the methanol extracts of *Albizia adianthifolia*, *Alchornea laxiflora*, *Laportea ovalifolia* and three other Cameroonian plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria // *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2017. Vol. 24, no. 4. P. 950–955. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.033>.
3. Cowan M.M. Plant products as antimicrobial agents // *Clinical Microbiology Reviews*. 1999. Vol. 12, no. 4. P. 564–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>.
4. Ibrahim N., Kebede A. In vitro antibacterial activities of methanol and aqueous leave extracts of selected medicinal plants against human pathogenic bacteria // *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020. Vol. 27, no. 9. P. 2261–2268. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.06.047>.
5. Zaidan M. R. S., Noor Rain A., Badrul A. R., Adlin A., Norazah A., Zakiah I. *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method // *Tropical Biomedicine*. 2005. Vol. 22, no. 2. P. 165–170.
6. Mostafa A. A., Al-Askar A. A., Almaary K. S., Dawoud T. M., Sholkamy E. N., Bakri M. M. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases // *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2018. Vol. 25, no. 2. P. 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>.
7. Singh S. K., Vishnoi R., Dhingra G. K., Kishor K. Antibacterial activity of leaf extracts of some selected traditional medicinal plants of Uttarakhand, North East India // *Journal of Applied and Natural Science*. 2012. Vol. 4, no. 1. P. 47–50. <https://doi.org/10.31018/jans.v4i1.220>.
8. Muhialdin B.J., Kadum H., Fathallah S., Meor Hussin A. S. Metabolomics profiling and antibacterial activity of fermented ginger paste extends the shelf life of hicken meat // *LWT – Food Science and Technology*. 2020. Vol. 132. P. 109897. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109897>.
9. Omer M. K., Álvarez-Ordoñez A., Prieto M., Skjerve E., Asehun T., Alvseike O. A. A systematic review of bacterial foodborne outbreaks related to red meat and meat products // *Foodborne Pathogens and Disease*. 2018. Vol. 15, no. 10. P. 598–611. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2393>.
10. Loukieh M., Mouannes E., Jaoudeh C. J. A., Wakim L. H., Fancello F., Zeidan M. B., et. al. Street foods in Beirut city: An assessment of the food safety practices and of the microbiological quality // *Journal of Food Safety*. 2018. Vol. 38, no. 3. P. e12455. <https://doi.org/10.1111/jfs.12455>.
11. Gaulin C., Fiset M., Duchesne C., Ramsay D., Savard N., Urbanek A., et al. Scientific writing: Salmonella thompson outbreak associated with consumption of chicken shawarma and the usefulness of genome sequencing in the investigation // *Canada Communicable Disease Report*. 2017. Vol. 43, no. 9. P. 186–192. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v43i09a05>.
12. Cagri-Mehmetoglu A. Food safety challenges associated with traditional foods of Turkey // *Food Science and Technology*. 2018. Vol. 38, no. 1. 12 p. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.36916>.
13. Gupta S., Ravishankar S. A comparison of the antimicrobial activity of garlic, ginger, carrot, and turmeric pastes against *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory buffer and ground beef // *Foodborne Pathogens and Disease*. 2005. Vol. 2, no. 4. P. 330–340. <https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.330>.
14. Ahhmed A., Özcan C., Karaman S., Öztürk I., Çam M., Fayemi P. O., et al. Utilization of fermented soybeans paste as flavoring lamination for Turkish dry-cured meat // *Meat Science*. 2017. Vol. 127. P. 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.12.011>.
15. Gebashe F., Aremu A. O., Gruz J., Finnie J. F., Van Staden J. Phytochemical profiles and antioxidant activity of grasses used in South African traditional medicine // *Plants*. 2020. Vol. 9, no. 3. P. 371. <https://doi.org/10.3390/plants9030371>.
16. Teleszko M., Wojdyło A. Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves // *Journal of Functional Foods*. 2015. Vol. 14. P. 736–746. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.041>.
17. M'arquez-Rodríguez A. S., Nevárez-Baca S., Lerma-Hernández J. C., Hernández-Ochoa L. R., Nevárez-Moorillon G. V., Gutiérrez-Méndez N., et. al. In vitro antibacterial activity of *Hibiscus sabdariffa* L. phenolic extract and its in situ application on shelf-life of beef meat // *Foods*. 2020. Vol. 9, no. 8. P. 1080. <https://doi.org/10.3390/foods9081080>.
18. McMurray R.L., Ball M. E. E., Tunney M. M., Corcionivoschi N., Situ C. Antibacterial activity of four plant extracts extracted from traditional chinese

medicinal plants against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* // *Microorganisms*. 2020. Vol. 8, no. 6. P. 962. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060962>.

19. BouarabChibane L., Degraeve P., Ferhout H., Bouajila J., Oulahal N. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019. Vol. 99, no. 4. P. 1457–1474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9357>.

20. Efenberger-Szmechtyk M., Nowak A., Czyżowska A., Kucharska A. Z., Fecka I. Composition and antibacterial activity of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, *Cornus mas* L. and *Chaenomeles superba* Lindl. leaf extracts // *Molecules*. 2020. Vol.

25, no. 9. P. 2011. <https://doi.org/10.3390/molecules25092011>.

21. 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. Vol. 10, no. 4. P. 613–626. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-613-626>.

22. Eremeeva N. B., Makarova N. V., Zhidkova E. M., Maximova V. P., Lesova E. A. Ultrasonic and microwave activation of raspberry extract: antioxidant and anti-carcinogenic properties // *Foods and Raw Materials*. 2019. Vol. 7. No. 2. P. 264–273. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-264-273>.

REFERENCES

1. Pallett A., Hand K. Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010;65(3):iii25–iii33. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq298>.

2. Tchinda C. F., Voukeng I. K., Beng V. P., Kuete V. Antibacterial activities of the methanol extracts of *Albizia adianthifolia*, *Alchornea laxiflora*, *Laportea ovalifolia* and three other Cameroonian plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2017;24(4): 950–955. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.033>.

3. Cowan M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12(4): 564–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>.

4. Ibrahim N., Kebede A. In vitro antibacterial activities of methanol and aqueous leave extracts of selected medicinal plants against human pathogenic bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020; 27(9):2261–2268. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.06.047>.

5. Zaidan M. R. S., Noor Rain A., Badrul A. R., Adlin A., Norazah A., Zakiah I. In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Tropical Biomedicine*. 2005;22(2):165–170.

6. Mostafa A. A., Al-Askar A. A., Almaary K. S., Dawoud T. M., Sholkamy E. N., Bakri M. M. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2018;25(2):361–366. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>.

7. Singh S. K., Vishnoi R., Dhingra G. K., Kishor K. Antibacterial activity of leaf extracts of some selected traditional medicinal plants of Uttarakhand, North East India. *Journal of Applied and Natural Science*. 2012; 4(1):47–50. <https://doi.org/10.31018/jans.v4i1.220>.

8. Muhiyaldin B.J., Kadum H., Fathallah S., Meor Hussin A. S. Metabolomics profiling and antibacterial activity of fermented ginger paste extends the shelf life of chicken meat. *LWT – Food Science and Technology*. 2020;132:109897. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109897>.

16/j.lwt.2020.109897.

9. Omer M. K., Álvarez-Ordoñez A., Prieto M., Skjerve E., Asehun T., Alvseike O. A. A systematic review of bacterial foodborne outbreaks related to red meat and meat products. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2018;15(10):598–611. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2393>.

10. Loukieh M., Mouannes E., Jaoudeh C. J. A., Wakim L. H., Fancello F., Zeidan M. B., et al. Street foods in Beirut city: An assessment of the food safety practices and of the microbiological quality. *Journal of Food Safety*. 2018;38(3):e12455. <https://doi.org/10.1111/jfs.12455>.

11. Gaulin C., Fiset M., Duchesne C., Ramsay D., Savard N., Urbanek A., et al. Scientific writing: *Salmonella thompson* outbreak associated with consumption of chicken shawarma and the usefulness of genome sequencing in the investigation. *Canada Communicable Disease Report*. 2017;43(9):186–192. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v43i09a05>.

12. Cagri-Mehmetoglu A. Food safety challenges associated with traditional foods of Turkey. *Food Science and Technology*. 2018;38(1). 12 p. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.36916>.

13. Gupta S., Ravishankar S. A comparison of the antimicrobial activity of garlic, ginger, carrot, and turmeric pastes against *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory buffer and ground beef. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2005;2(4):330–340. <https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.330>.

14. Ahmmed A., Özcan C., Karaman S., Öztürk I., Çam M., Fayemi P. O., et al. Utilization of fermented soybeans paste as flavoring lamination for Turkish dry-cured meat. *Meat Science*. 2017;127:35–44. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.12.011>.

15. Gebashe F., Aremu A. O., Gruz J., Finnie J. F., Van Staden J. Phytochemical profiles and antioxidant activity of grasses used in South African traditional medicine. *Plants*. 2020;9(3):371. <https://doi.org/10.3390/plants9030371>.

16. Teleszko M., Wojdyło A. Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential be-

tween selected edible fruits and their leaves. Journal of Functional Foods. 2015;14:736–746. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.041>.

17. Márquez-Rodríguez A. S., Nevárez-Baca S., Lerma-Hernández J. C., Hernández-Ochoa L. R., Nevárez-Moorillon G. V., Gutiérrez-Méndez N., et al. In vitro antibacterial activity of Hibiscus sabdariffa L. phenolic extract and its in situ application on shelf-life of beef meat. Foods. 2020;9(8):1080. <https://doi.org/10.3390/foods9081080>.

18. McMurray R.L., Ball M. E. E., Tunney M. M., Corcionivoschi N., Situ C. Antibacterial activity of four plant extracts extracted from traditional chinese medicinal plants against Listeria monocytogenes, Escherichia coli, and Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis. Microorganisms. 2020;8(6):962. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060962>.

19. BouarabChibane L., Degraeve P., Ferhout H., Bouajila J., Oulahal N. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2019;99(4):

1457–1474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9357>.

20. Efenberger-Szmechtyk M., Nowak A., Czyżowska A., Kucharska A. Z., Fecka I. Composition and antibacterial activity of Aronia melanocarpa (Michx.) Elliot, Cornus mas L. and Chaenomeles superba Lindl. leaf extracts. Molecules. 2020;25(9):2011. <https://doi.org/10.3390/molecules25092011>.

21. Eremeeva N. B., Makarova N. V., Ignatova D. F., Bakharev V. V. 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>.

22. Eremeeva N. B., Makarova N. V., Zhidkova E. M., Maximova V. P., Lesova E. A. Ultrasonic and microwave activation of raspberry extract: antioxidant and anti-carcinogenic properties. Foods and Raw Materials. 2019;7(2):264–273. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-264-273>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Н. Б. Еремеева,

к.т.н., доцент,
Университет ИТМО,
197101, г. С.-Петербург, Кронверкский пр-т, 49,
Российская Федерация,
eremeeva.itmo@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-9632-6296>

Н. В. Макарова,

д.х.н., профессор, заведующая кафедрой
технологии и организации общественного
питания,
Самарский государственный технический
университет,
443100, г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244,
Российская Федерация,
makarovanv1969@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0112-0085>

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.

Информация о статье

Поступила в редакцию 13.10.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalya B. Eremeeva,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
ITMO University,
49, Kronverkskii Ave., St. Petersburg, 191002,
Russian Federation,
e-mail: eremeeva.itmo@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-9632-6296>

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,
makarovanv1969@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0112-0085>

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.

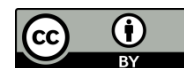
Information about the article

The article was submitted 13.10.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.

Научная статья

УДК 664.38:796/799

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-603-616>



Обоснование использования биопотенциала гидролизатов коллагенсодержащего рыбного сырья в протеиновом спортивном питании

Юлия Олеговна Некрасова*, Ольга Яковлевна Мезенова*,
Йорг-Томас Мерзель**

*Калининградский государственный технический университет,
г. Калининград, Российская Федерация

** Научно-исследовательская лаборатория UBF, г. Альтландсберг, Германия

Автор, ответственный за переписку: Некрасова Юлия Олеговна, yulya.nekrasova.1998@mail.ru

Аннотация. Поскольку роль низкомолекулярных пептидов коллагенового происхождения очень важна в метаболизме организма, целью настоящей работы являлось обоснование использования продуктов гидролиза коллагенсодержащего рыбного сырья (чешуи) в составе протеинового питания спортсменов. Низкомолекулярная сублимированная пептидная водорастворимая и высушенная водонерастворимая белково-минеральная добавки из чешуи сардины/сардинеллы получены методом ферментативно-термического гидролиза. Исследован биопотенциал продуктов гидролиза чешуи и вспомогательных пищевых добавок (яблочные выжимки, льняной жмых, кедровые орехи) с применением стандартных и общепринятых методик. Оценка содержания белка и его аминокислотного состава в пептидной добавке и анализ минерального состава белково-минеральной добавки показали высокий биопотенциал добавок по названным критериям. Пептидная добавка содержит все незаменимые аминокислоты при биологической ценности 59,9%. В белково-минеральной добавке отсутствует триптофан, но много кальция (22,2 г/100 г) и фосфора (12,0 г/100 г). Показано высокое содержание функциональных пищевых ингредиентов (белка, пектина, целлюлозы, полифенолов, минеральных веществ, витамина С) во вспомогательном растительном сырье. Обоснована форма продукта спортивного питания в виде порционного батончика в шоколадной глазури. Установлена основная рецептура протеинового батончика массой 60 г с требуемым содержанием белка, заданной структурой и высокими потребительскими свойствами. При содержании белка 23,5% батончик обеспечивает 24,1% калорийности продукта, что соответствует «высокобелковому продукту» спортивного питания согласно ГОСТ 34006-2016. Биологическая ценность белка батончика увеличилась относительно пептидной добавки на 12% и составила 71,38%. Протеиновый батончик спортивного питания является функциональным по содержанию аминокислот (изолейцин, лейцин, валин, метионин и цистин, фенилаланин и тирозин, триптофан, лизин, треонин, аланин, аргинин, гистидин, глицин, карнозин, таурин, орнитин, цитруллин), клетчатки, полифенолов, кальция и фосфора и рекомендуется спортсменам и людям, ведущим активный образ жизни.

Ключевые слова: коллагенсодержащее рыбное сырье, чешуя, спортивное питание, протеиновый батончик, биологическая ценность, функциональные пищевые ингредиенты, функциональный продукт

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам научно-консультационной лаборатории UBF (г. Альтландсберг, Германия) и коллегам за консультации и помощь в проведении аналитических исследований.

Для цитирования: Некрасова Ю. О., Мезенова О. Я., Мерзель Й.-Т. Обоснование использования биопотенциала гидролизатов коллагенсодержащего рыбного сырья в протеиновом спортивном питании // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 603–616. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-603-616>.

Biopotential of collagen-containing hydrolysates obtained from fish raw materials for protein sports nutrition

Yuliya O. Nekrasova*, Olga Ya. Mezenova*,
Joerg-Thomas Moersel**

*Kaliningrad State Technical University, г. Калининград, Российская Федерация

**UBF-Untersuchungs-, Beratungs-, Forschungslaboratorium GmbH, Altlandsberg, Germany

Corresponding author: Yuliya O. Nekrasova, yulya.nekrasova.1998@mail.ru

Abstract. Low-molecular peptides of collagen origin are of crucial importance for the body metabolism. This work aims to substantiate the use of the hydrolysates of collagen-containing fish raw materials (scale) for protein sports nutrition. Sublimated low-molecular weight peptide water-soluble and dried water-insoluble protein-mineral supplements from the sardine scale were obtained by enzymatic thermal hydrolysis. The biopotential of scale and auxiliary food additives (apple pomace, flaxseed cake, pine nuts) was investigated using standard methods. The protein content and amino acid composition of the peptide supplement and the mineral composition of the protein-mineral supplement were analysed; their high biopotential according to the above criteria was shown. The peptide supplement contains all essential amino acids having a biological value of 59.9%. The protein-mineral supplement contains no tryptophan but a high amount of calcium (22.2 g/100 g) and phosphorus (12.0 g/100 g). The high content of functional food ingredients (protein, pectin, cellulose, polyphenols, minerals, vitamin C) in auxiliary vegetable raw materials was shown. The shape of a sports nutrition product (chocolate glazed protein bar) was substantiated. The basic recipe of a 60 g protein bar having the required protein content, a given structure and high consumer properties was established. Having a protein content of 23.5%, the bar provides a 24.1% calorific value, which corresponds to the "protein-rich food" for sports nutrition according to GOST 34006-2016. The biological protein value in the bar increased relative to the peptide supplement by 12% and amounted to 71.38%. The developed protein sports nutrition bar is dietary balanced by the content of amino acids (isoleucine, leucine, valine, methionine and cysteine, phenylalanine and tyrosine, tryptophan, lysine, threonine, alanine, arginine, histidine, glycine, carnosine, taurine, ornithine, citrulline), fibre, polyphenols, calcium and phosphorus and is recommended for athletes and people having an active lifestyle.

Keywords: collagen-containing fish raw materials, scale, sports nutrition, protein bar, biological value, functional food ingredients, functional food product

Acknowledgments. The authors are grateful to the staff of the UBF-Untersuchungs-, Beratungs-, Forschungslaboratorium GmbH (Altlandsberg, Germany) and colleagues for their advice and assistance in conducting analytical studies.

For citation: Nekrasova Yu. O., Mezenova O. Ya., Moersel J.-Th. Biopotential of collagen-containing hydrolysates obtained from fish raw materials for protein sports nutrition. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):603-616. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-603-616>.

ВВЕДЕНИЕ

Спортивные нагрузки сопровождаются большим расходом энергии, нервно-психологическим напряжением, что обуславливает повышенную потребность организма в энергии и отдельных пищевых веществах. Питание является важным элементом подготовки спортсменов, снабжая организм энергией, необходимой для поддержания постоянной температуры тела, осуществления всех биологических функций и биохимических процессов, а также выполнения мышцами механической работы. Правильное построение суточного рациона – один из важнейших способов обеспечения работоспособности спортсмена, несбалансированное же питание, напротив, значительно снижает защитные силы организма и может способствовать возникновению многих

заболеваний [1, 2].

Главными тенденциями развития рынка спортивного питания в России можно считать разработку новых продуктов, оказывающих эффективное специфическое воздействие во время тренировочного процесса [3, 4].

Наиболее популярны среди потребителей протеиновые батончики, в состав которых входят углеводы, пищевые волокна, витамины, минеральные вещества и повышенное количество белка [5]. В качестве источника белка используются в основном протеиновые гидролизаты, получаемые из молочной сыворотки и соевого белка. Перспективным направлением является использование протеиновых гидролизатов из коллагенсодержащего вторичного рыбного сырья. При переработке рыбы на пищевые цели по тра-

диционными технологиям остается очень много отходов, богатых белком, основной частью которого является коллаген. Это головы, кожа, внутренности, чешуя, кости, плавники и др., которые сегодня используются на кормовые цели или утилизируются. Протеины данного сырья входят в состав важных органов и тканей, находятся в комплексе с минеральными, липидными и нуклеиновыми материалами, содержат все незаменимые и ценные заменимые аминокислоты, что свидетельствует о его высокой биологической ценности [6, 7]. Богатейшим источником коллагена является чешуя рыб, которая из-за высокой клейкости при варке и повышенной минерализованности практически не используется на кормовые цели, представляя серьезную экологическую проблему на рыбоперерабатывающих предприятиях [8, 9].

На кафедре пищевой биотехнологии Калининградского государственного технического университета (КГТУ) (г. Калининград, Россия) разработан и апробирован способ получения протеиновых композиций из вторичного рыбного сырья путем гидротермальной нехимической технологии, основанной на термическом разрушении белков в воде под давлением, экстракции образующихся пептидов в водную среду, их отделения и сушке. При этом остается негидролизированная водонерастворимая осадочная часть, представляющая собой композицию высокомолекулярного коллагена с минеральными веществами [10]. Установлено, что молекулярная масса водорастворимых пептидов колеблется от 0,1 до 100 кДа, при этом более 90% из них относится к активным пептидам (молекулярная масса менее 10 кДа) [11]. Низкомолекулярные активные пептиды коллагенсодержащего сырья имеют доказанную физиологическую активность, востребованную в спортивном питании [12].

Одна из установленных функций активных пептидов морского происхождения – антиоксидантная. Антимикробные пептиды, выделенные из рыбьего коллагена, проявляют широкий спектр антибактериальной активности, которая основана на доказанных антибактериальных, противовирусных, противогрибковых, иммуномодуляторных и противоопухолевых эффектах, в том числе в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий [13, 14].

Одной из наиболее изученных характеристик биоактивных пептидов коллагенового происхождения, полученных из кожи карпа путем гидролиза протеолитическими ферментами (алкалаза, коллагеназа, протеиназа и/или трипсин), является ингибирующая активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), что играет решающую роль в профилактике гипертонии, сопровождающей спортсмена при повышенных физических нагрузках [15].

Важное значение в спорте имеют репаратив-

ные процессы. Чрезмерно высокие физические нагрузки оказывают негативное воздействие на костно-суставной аппарат, сердечно-сосудистую и мышечную системы, что в свою очередь ведет к развитию остеопороза и тяжелой патологии опорно-двигательного аппарата [16]. Психологическое перенапряжение формирует стрессовое состояние организма, в связи с чем возникает необходимость в употреблении веществ, способствующих эффективной и быстрой профилактике «острых зон». Такими веществами потенциально являются биологически ценные протеины, коллагеновые белки, продукты их гидролиза, а также нутрицевтики и парафармацевтики растительного происхождения. Коллаген дает организму спортсменов такие особо важные аминокислоты, как глицин (нейромедиатор), креатин, пролин и оксипролин (строительный материал связок), глютамин (активатор иммунной системы) и другие, необходимые для поддержания активности организма [17].

Установлено, что коллаген, выделенный из рыбного сырья (ихтиоколлаген), имеет высокую биосовместимость с коллагеном человека [18]. Биологически активные пептиды рыбного коллагена оказывают положительное влияние не только на синтез коллагена человека, но и на минерализацию матрицы остеобластов, что свидетельствует о потенциальной полезности использования продуктов его гидролиза в качестве биоматериала для регенерации костной ткани в профилактике травм костных тканей в спорте [19]. Ионы кальция стимулируют биосинтез коллагена посредством действия на Са-чувствительный рецептор CASR и костный морфогенетический белок BMP4. Синтез коллагена в организме поддерживается действием определенных «остеотропных» микронутриентов – ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , выступающих в роли кофакторов соответствующих ферментов. Поэтому, например, кальцийсодержащие композиции способствуют повышению эффективности коллагенообразования в соединительной ткани [20].

Исследования элементного состава минеральной части чешуи выявили повышенное содержание ионов кальция и фосфора в чешуе сардины и сардинеллы в соотношении 2:1, близком к рекомендуемому в питании спортсменов [21].

Помимо биологически активных протеиновых композиций, получаемых из чешуи рыб методом глубокого гидролиза, в поликомпонентных продуктах спортивного питания гармоничным дополнением являются функциональные компоненты растительного происхождения. В связи с этим целесообразно использовать биопотенциал (химический состав, биологическую ценность) кедровых орехов, жмыха льняного семени и яблочных выжимок, содержащих ценные протеиновые и липидные фракции, полифенольные компоненты, органические кислоты, витамины, минеральные вещества и дру-

гие БАВы, нужные спортсмену.

Целью настоящего исследования являлось изучение биопотенциала гидролизатов рыбной чешуи как основного и перспективного коллагенсодержащего материала (после гидролиза) и обоснование получения на их основе пищевой композиции, эффективной в спортивном питании, в форме протеинового батончика.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводились в лаборатории кафедры пищевой биотехнологии КГТУ и в научно-консультационной лаборатории UBF (г. Альтландсберг, Германия). В качестве основного сырья для производства протеинового батончика применяли водорастворимую и нерастворимую фракции, получаемые из чешуи сардины/сардинеллы способом глубокого гидролиза, основанном на ферментативной обработке в сочетании с термогидролизом. Для ферментативной обработки использовали протеиназу микробиологического происхождения Alcalase 2,5L (Novozymes, Дания): активность – 2,5 AU/г (единицы Ансона); $t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH}=7,0$. При проведении ферментативного гидролиза гомогенизированную смесь измельченной чешуи с горячей водой $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ при гидромодуле 1:1 и $\text{pH}=7,0$ выдерживали в течение 6 ч при постоянном перемешивании. Измельчение чешуи проводили с целью увеличения ее удельной поверхности для интенсификации ферментализации в специальном измельчителе. Первоначальный размер чешуек составлял 0,6–0,8 см, в измельченном виде средний размер частичек составил 0,2–0,3 см.

Термогидролиз ферментированной системы вели при температуре $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, давлении 0,25 МПа, $\text{pH}=7,0$ в течение 60 мин в автоклаве. Последующее разделение фракций проводили центрифугированием при скорости вращения 3500 об./мин в течение 10 мин. Далее систему охлаждали и разделяли на пептидную водорастворимую (низкомолекулярную) фракцию и белково-минеральную (водонерастворимую, осадочную), содержащую высокомолекулярные белки. Полученные фракции обезвоживали сублимационным и конвекционным способами соответственно, получая пептидную и белково-минеральные добавки, которые использовали в качестве основных компонентов в составе продукта спортивного питания в форме порционного батончика [22].

Отнесение полученных добавок к пищевым основано на результатах их химического анализа [10, 11] и технологии их изготовления при температуре термогидролиза сырья $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, обеспечивающей полную санитарную безопасность. На технологию получения и качество пищевых пептидной и белково-минеральной добавок из чешуи рыб разработаны и утверждены технические условия (ТУ 9283-005-00471544-2019) и соответствующая

технологическая инструкция.

Исходная чешуя и полученные пептидная и белково-минеральная добавки, использованные в работе, по показателям безопасности соответствовали требованиям ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и ТР ЕАЭС 040/2016 «О безопасности рыбы и рыбной продукции».

Для повышения биологической ценности белка протеинового батончика и роста его пищевой ценности по содержанию биологически активных веществ в составе нового продукта применяли яблочные выжимки, льняной жмых, кедровые орехи, соответствующие по качеству ГОСТ 31852-2012, ГОСТ 10974-95.

Для оптимизации рецептуры батончика по содержанию добавок из чешуи проводили специальные эксперименты с применением математического моделирования согласно ортогональному центральному композиционному плану (ОЦКП) 2-го порядка для двух факторов – пептидной и белково-минеральной добавок – ПД и БМД. В обобщенный параметр оптимизации вошли следующие частные отклики: содержание белка в готовой продукции (не менее 20% от его энергетической ценности, согласно ГОСТ 34006-2016 «Продукция пищевая специализированная для питания спортсменов. Термины и определения»), содержание кальция и фосфора на функциональном уровне, при этом обеспечивая оптимальное соотношение данных макроэлементов – 1:2.

Массовую долю влаги, жира и золы определяли соответственно по ГОСТ 5900-2014, ГОСТ 31902-2012 и ГОСТ 5901-2014. Массовую долю белка определяли по методу Кьельдаля. Аминокислотный состав (АКС) белков пептидной и белково-минеральной добавок определяли ионно-обменной хроматографией на приборе Асme IC System. Минеральный состав белково-минеральной добавки определяли по методу атомно-абсорбционной спектроскопии на атомно-абсорбционном спектрометре серии AAS 5 FL (Carl Zeiss Jena GmbH, Германия). Содержание лигнина определяли по ГОСТ 26177-84, содержание пектиновых веществ – методом Мелитца¹. Количество витамина С определяли йодометрическим методом в соответствии с ГОСТ 24556-89. Определение суммы фенольных веществ проводили на спектрофотометре U-3000 (Hitachi, Япония) при длине волны 760 нм с реактивом Фолина – Чокальтеу, в качестве стандарта использовали галловую кислоту SOP 3.IV.18_2 (StandardOperationProcedures 3.IV.18_2. Биологическую ценность (БЦ) белков, содержащихся в батончике, определяли по нескольким показателям: аминокислотный (АК) скор, коэффициент утилитарности АК состава, коэффициент различия АК скор. Сбалансированность аминокис-

¹Донченко Л. В. Методы количественного определения пектиновых веществ в растительном сырье: методические указания к практическим занятиям. Краснодар: Изд-во КубГАУ, 2005. 30 с.

лотного (АК) состава относительно «идеального» белка оценивали по АК-скорю согласно методике ФАО/ВОЗ. Энергетическую ценность готового продукта определяли путем пересчета количества макроэлементов на коэффициенты энергетической ценности (ккал/100 г): для белков и углеводов – 4, для жиров – 9.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований необходимо было доказать целесообразность получения и использования в рецептуре протеинового батончика для спортивного питания двух видов протеиновых добавок, получаемых путем ферментации с последующим термолизом коллагенсодержащей чешуи сардины/сардинеллы. Добавки представляют собой обезвоженные порошки – водорастворимый пептидный гидролизат и белково-минеральная тонкодисперсная нерастворимая добавка со специфическими вкусо-ароматическими свойствами, характерными для рыбных гидролизатов. Данные добавки были использованы в качестве основных компонентов в проектируемой рецептуре протеинового продукта.

Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что пептидная добавка отличается высоким содержанием протеиновых компонентов – 98,85 г/100 г продукта, в то время как в белково-минеральной добавке содержание белка составляет 21,09 г/100 г.

Таблица 1. Содержание белка в пептидной и белково-минеральной добавках

Table 1. Protein content in protein hydrolysate and protein-mineral supplement

Продукт	Содержание белка, г/100 г продукта
Пептидная добавка	98,85
Белково-минеральная добавка	21,09

В табл. 2 приведены характеристики аминокислотных составов протеиновых фракций пептидной и белково-минеральной добавок.

Аминокислотный состав пептидной добавки характеризуется содержанием всех незаменимых аминокислот, в особенности повышенным содержанием лизина, лейцина, фенилаланина. Среди заменимых аминокислот повышенным содержанием отличаются аланин, аргинин, глицин. Хроматографический анализ позволил обнаружить также и другие азотистые соединения (карнозин, цитруллин, орнитин и таурин), имеющие биологическую ценность.

L-цитруллин снижает концентрацию лактата и мышечную боль через 24 ч после тренировки [23]. Карнозин отвечает за активацию АТФазы в выработке энергии для мышечной деятельности, хелатирование и гомеостаз ионов металлов (меди, цинка и железа) [24]. Таурин активно участ-

вует в регуляции высвобождения Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума и помогает поддерживать чувствительность сократительных элементов к Ca^{2+} , что чрезвычайно важно в спорте [25]. Орнитин является эффективным регулятором процессов утомления и восстановления организма спортсменов после интенсивных физических нагрузок. Данная аминокислота способна снижать выраженность аммиак-индуцированных проявлений утомления и повреждения скелетных мышц [26].

Таблица 2. Аминокислотный состав пептидной и белково-минеральной добавок, полученных из чешуи сардины/сардинеллы методом ферментативно-термического гидролиза (г/100 г чешуи)

Table 2. Amino acid composition of protein and protein-mineral additives obtained from sardine/sardinella scales (g/100 g scale)

Аминокислота	Пептидная добавка	Белково-минеральная добавка
Незаменимые аминокислоты		
Изолейцин	5,07	0,22
Лейцин	11,68	1,38
Валин	7,68	0,46
Метионин	5,41	0,31
Фенилаланин	6,81	0,73
Триптофан	0,98	0
Лизин	9,89	1,17
Треонин	5,13	0,97
Заменимые аминокислоты		
Аланин	9,99	1,04
Аргинин	8,75	2,06
Аспарагин	1,38	0,29
Аспарагиновая кислота	2,50	0,96
Карнозин	0,32	0
Цитруллин	0,79	0
Глутамин	1,17	0,14
Глутаминовая кислота	6,20	0,52
Глицин	7,16	0,75
Гистидин	3,90	0,94
Гидроксипролин	0,48	0
Орнитин	3,56	0,16
Пролин	2,75	0,20
Серин	4,41	1,14
Таурин	1,64	0,33
Тирозин	3,68	0,62

Аминокислотный состав белково-минеральной добавки характеризуется высоким содержанием среди заменимых АК аланина, аргинина, серина, аспарагиновой кислоты, глицина, гистидина. Среди незаменимых АК высоким содержанием отличаются треонин, лизин и лейцин. Однако отсутствие триптофана снижает биологическую ценность белка данной добавки. Показатели биологической ценности пептидной и белково-минеральной добавок, представлены в табл. 3.

Таблица 3. Биологическая ценность белковой фракции пептидной и белково-минеральной добавок

Table 3. Biological value of protein fractions of protein and protein-mineral supplement

Аминокислота	Содержание АК в белке «эталона» ФАО/ВОЗ, г/100 г	Пептидная добавка		Белково-минеральная добавка	
		АК в исследуемом белке, г/100 г	АКС, %	АК в исследуемом белке, г/100 г	АКС, %
Изолейцин	2,8	5,12	182,85	1,04	37,14
Лейцин	6,3	11,81	187,46	6,54	103,80
Лизин	4,8	10,00	208,33	5,55	115,62
Метионин + цистин	2,3	5,47	237,82	1,47	63,91
Фенилаланин + тирозин	4,1	10,60	258,53	6,40	156,09
Треонин	2,5	5,18	207,20	4,60	184,00
Триптофан	0,6	0,99	165,00	0	0
Валин	4,0	7,76	194,00	2,18	54,50
Коэффициент различия аминокислотного состава (КРАС), %		40,1		89,3	
Биологическая ценность, %		59,9		10,7	
Коэффициент утилитарности аминокислотного состава, доли ед.		0,79		–	

На основании данных, представленных в табл. 3, можно сделать вывод о достаточно высокой биологической ценности белка пептидной добавки (59,9%). Полноценность и аминокислотная эффективность данной добавки подтверждается значениями аминокислотных скоров для всех незаменимых аминокислот выше 100% (165–258,53%), при этом лимитирующей аминокислотой является триптофан (скор 165%). Обобщающий коэффициент утилитарности аминокислотного состава (0,79) характеризует высокую степень сбалансированности незаменимых аминокислот по отношению к физиологической норме. Протеиновая часть белково-минеральной добавки характеризуется низкой биологической ценностью (10,7%), что объясняется отсутствием незаменимой аминокислоты триптофан. Однако белково-минеральная добавка помимо белка является источником ценных минеральных веществ, отсутствующих в пептидной добавке, но которые необходимы в питании спортсмена в повышенном количестве.

Содержание основных минеральных веществ (кальций, фосфор, магний, калий, натрий) в белково-минеральной добавке представлено в табл. 4. Как видно из табл. 4, белково-минеральная добавка характеризуется высоким содержанием кальция и фосфора при их рациональном соотношении: на долю Са приходится 22,19%, на долю Р – 11,9%. Данные макроэлементы особенно важны в спортивном питании: кальций необходим для строительства костной ткани, участвует в процессах сокращения мышечной ткани, фосфор входит в состав нуклеопротеидов, нуклеотидов, фосфопротеидов, фосфатидов, фосфорных эфиров углеводов, обеспечивает высокое содержание молекул АТФ в крови [27, 28].

Таким образом, пептидная водорастворимая добавка, полученная из чешуи, может быть введена в рецептуру протеинового батончика в качестве источника физиологически активных пеп-

тидов и аминокислот при их высокой сбалансированности, а также ценных биологически активных азотистых соединений (орнитин, цитруллин, таурин, карнозин), которые важны в спортивном питании. Белково-минеральная добавка также рациональна для проектируемого спортивного питания в качестве источника важных минеральных веществ, прежде всего, кальция и фосфора.

Таблица 4. Содержание минеральных веществ в белково-минеральной добавке, г/100 г

Table 4. Content of mineral substances in the protein-mineral supplement, g/100 g

Минеральные вещества (макроэлементы)	Содержание в белково-минеральной добавке, г/100 г
Na	0,21
K	0,09
Ca	22,19
Mg	0,32
P	11,97

На следующем этапе исследований оценивали биопотенциал и рациональность использования в составе протеинового батончика вспомогательных компонентов – яблочного жмыха, льняного жмыха, кедровых орехов – в качестве источников белка, пищевых волокон, витаминов, органических кислот, аминокислот и других нутрицевтиков и парафармацевтиков, важных в питании спортсмена. Для покрытия батончика, придания ему привлекательного вида и приятных органолептических свойств использовали шоколадную глазурь.

Химический состав яблочного жмыха, остающегося после получения сока из яблок сорта Гала прямым отжимом, представлен в табл. 5. Как видно из полученных данных, яблочное сырье характеризуется высоким содержанием углеводов, в особенности пищевых волокон клетчатки (9,94%) и пектина (3,1%), а также витамина

С (21,3 мг%) и полифенолов (25,4 мг%).

Таблица 5. Биопотенциал яблочных выжимок

Table 5. Biopotential of apple pomace

Показатель	Содержание, г/100 г продукта
Влага	80,20
Сухие вещества	19,80
Белок	0,38
Жир	0,69
Зола	0,81
Углеводы, в том числе:	17,92
сырая клетчатка	9,94
Лигнин (пересчет на содержание клетчатки)	1,60
Пектин	3,10
Витамин С, мг%	21,30
Полифенолы, мг%	25,40
Кислотность (в пересчете на яблочную кислоту), %	0,065

Анализ химического состава льняного жмыха (табл. 6) показывает, что данное сырье содержит большое количество клетчатки и лигнина, которые необходимы для нормальной работы желудочно-кишечного тракта. Также льняной жмых богат полифенолами (более 1,2 г/100 г), среди которых высоким содержанием отличаются лигнаны. Основным лигнаном в льняном семени является SDG (диглюкозид секоизоларицезинола), который находится в связанной макромолекулярной структуре [31]. Лигнандиглюкозид секоизоларицезинола обладает антиоксидантными, противовоспалительными и противоопухолевыми свойствами. В результате его действия повышается иммунитет организма, снижается вероятность возникновения воспалительных процессов [32]. Также льняной жмых содержит около 30% белка и относится к высокобелковым сырьевым ресурсам, что обуславливает рациональность использования его аминокислотного потенциала для повышения биологической ценности белка в целевом продукте спортивного питания.

Таблица 6. Биопотенциал жмыха льняного семени

Table 6. Biopotential of flax seed cake

Показатель	Содержание, г/100 г продукта
Влага	8,89
Сухие вещества	91,11
Белок	30,17
Жир	14,24
Зола	4,69
Углеводы, в том числе:	42,01
Сырая клетчатка	36,53
Лигнин (пересчет на сухое вещество)	2,90
Полифенолы, мг%	1251,70

Известно, что яблочный пектин как структурный гидрополисахарид обладает высокой степе-

ню этерификации и особенно высоким содержанием разветвленных боковых цепей, что обуславливает его функции структурообразователя. При введении в поликомпонентную рецептуру батончика молекулы пектина «скрепляют» отдельные компоненты батончика за счет взаимодействия с другими функциональными группами, делая его однородным и придавая необходимую структуру [29]. Полифенолы в основном состоят из гликозидов флоридзина, эпикатехина, хлорогеновой кислоты и кверцетина, обладающих провитаминным и антиоксидантным эффектами [30].

Кедровый орех, как видно из табл. 7, отличается высоким содержанием жира (66,96%), который характеризуются наличием полиненасыщенных жирных кислот [33]. Помимо жира отмечается высокое содержание белка (30,17%). Благодаря аминокислотному составу белки кедрового ореха имеют исключительно высокую биологическую ценность, поэтому сами орехи могут успешно использоваться для обогащения пищевых продуктов или в составе специализированного белкового питания [34]. Кроме того, в составе кедровых орехов идентифицированы полифенолы, являющиеся провитаминами и антиоксидантами (614 мг/100 г).

Таблица 7. Биопотенциал семян кедровой сосны

Table 7. Biopotential of cedar pine seeds

Показатель	Содержание, г/100 г продукта
Влага	3,34
Сухие вещества	96,66
Белок	14,95
Жир	66,96
Зола	2,15
Углеводы, в том числе:	12,60
сырая клетчатка	3,40
Полифенолы, мг%	614,00

Исходя из полученных результатов, исследованные льняной жмых, кедровый орех и яблочный выжимки в составе проектируемого протеинового батончика являются дополнительным источником биологически активных веществ (жирных кислот, витаминов, минеральных веществ, полифенолов, лигнанов, клетчатки, органических кислот), важных в питании спортсменов, а также людей, ведущих активный образ жизни.

На следующем этапе исследований была обоснована рецептура протеинового батончика с применением метода математического моделирования и оптимизации эксперимента, а также оценен его химический состав и биологическая ценность.

На основе полученной математической модели с натуральными значениями уровней факторов были определены оптимальные значения дозировок добавок из чешуи в порции батончика массой 60 г: пептидная добавка – 12,9 г, белково-минеральная добавка – 2,1 г:

$$y = 0,0057 \cdot \text{ПД}^2 + 0,6053 \cdot \text{БМД}^2 + 0,0024 \cdot \text{ПД} \cdot \text{БМД} - 0,1488 \cdot \text{ПД} - 2,2323 \cdot \text{БМД} + 3,4686,$$

где y – обобщенный параметр оптимизации, учитывающий содержание белка, кальция и фосфора в батончике; ПД и БМД – пептидная и белково-минеральная добавки соответственно.

С учетом полученных данных и на основании результатов органолептических исследований была предложена итоговая рецептура протеинового батончика, покрытого шоколадной глазурью (табл. 8).

Таблица 8. Рецептура протеинового батончика для спортивного питания

Table 8. Recipe of protein bar for sports nutrition

Ингредиент	Количество, г/100 г
Пептидная добавка	21,5
Белково-минеральная добавка	3,5
Яблочный жмых	16,7
Кедровый орех	15,0
Льняной жмых	35,0
Шоколадная глазурь	8,3

Приготовление протеинового батончика по заданной рецептуре проводили по следующей схеме: протирание яблочного жмыха, измельчение кедрового ореха, смешивание компонентов (пептидная добавка, белково-минеральная добавка, измельченный орех, льняной жмых, плодовая мякоть яблочного жмыха), формование батончиков массой 60 г, покрытие теплой шоколадной глазурью, охлаждение.

Оценку качества и биологической ценности готового продукта проводили путем анализа физико-химических показателей (табл. 9).

Из представленных в табл. 9 данных видно, что готовый протеиновый батончик массой 60 г является высокобелковым продуктом (МД белка 23,54%), функциональным по содержанию таких макроэлементов, как кальций и фосфор (удовлетворяет суточную потребность на 44% и 27,5 % соответственно), а также по уровню пищевых волокон (клетчатке) – на 72,15% и полифенолов – на 87,36%. При расчете энергетической ценности установлено, что доля белка в общей калорийности продукта составляет 24,14%, что позволяет отнести его к «высокобелковым продуктам» согласно ГОСТ 34006-2016.

Показатели биологической ценности (БЦ) белка протеинового батончика, определенные по нескольким показателям, приведены в табл. 10.

На основании полученных значений (см. табл. 10) можно сделать вывод о высокой биологической ценности белка полученного протеинового батончика. Например, показатель БЦ белка батончика имеет значение 71,38%, что свидетельствует о достаточной аминокислотной сбалансированности продукта, достигнутой путем комбинирования нескольких протеиновых источников. Полноценность белка в батончике подтверждается частными значениями аминокислотных скоров для всех незаменимых аминокислот выше 100% (180,5 – 245,85%), при этом лимитирующей аминокислотой является валин (скор 180,5%). Обобщающий коэффициент утилитарности аминокислотного состава, характеризующий степень сбалансированности незаменимых аминокислот по отношению к физиологически необходимой норме, также повысился и составляет 0,87.

Таблица 9. Физико-химические показатели батончика для спортивного питания

Table 9. Physical and chemical parameters of sports nutrition bar

Показатель	Результаты эксперимента	Пересчет на 60 г готового продукта, г/60 г	Суточная потребность**, г/сут.	Процент от суточной потребности (60 г продукта)
Массовая доля, %:				
влаги	13,47	8,10	–	–
сухих веществ	86,53	51,9	–	–
белка	23,54	14,12	81,7	17,20
жира	10,51	6,30	96,5	5,20
зола	4,22	2,53	–	–
углеводов*	48,26	28,95	–	–
в т.ч. клетчатки	24,05	14,43	20,0	72,15
Содержание:				
Са, г	0,73	0,44	1,0	44,00
Р, г	0,36	0,22	0,8	27,50
полифенолов, мг%	364,85	218,40	250,0	87,36
витамина С, мг%	3,45	2,07	90,0	2,20
Энергетическая ценность, ккал	390,03	234,0	–	–

*Массовая доля углеводов получена расчетным путем; **согласно МР 2.3.1.2432-08. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации.

Таблица 10. Показатели биологической ценности белка протеинового батончика

Table 10. Indicators of the protein bar biological value

Аминокислота	Содержание АК		АКС, %	КРАС, %	БЦ, %	У, доли. ед.
	в белке «эталона» ФАО/ВОЗ, г/100 г	в исследуемом белке, г/100 г				
Изолейцин	2,8	6,32	225,71	28,62	71,38	0,87
Лейцин	6,3	12,58	199,68			
Лизин	4,8	9,52	198,33			
Метионин + цистин	2,3	4,31	187,39			
Фенилаланин + тирозин	4,1	10,08	245,85			
Треонин	2,5	5,18	207,20			
Триптофан	0,6	1,37	228,33			
Валин	4,0	7,22	180,50			

В табл. 11 приведены показатели степени удовлетворения рекомендуемой суточной потребности по каждой аминокислоте, рассчитанные согласно МР 2.3.1.1915-04, в соответствии с которыми можно судить о протеиновой функциональности проектируемого продукта спортивного питания.

Рекомендуемая суточная доза протеинового батончика составляет 60 г (1 батончик), что может удовлетворить суточную потребность организма в основных аминокислотах более чем на 15%: в валине – на 40%, лейцине – 36,9%, изолейцине – 45%, лизине – 33,3%, метионине и цистине – 33,3%, треонине – 29,1%, триптофане – 25%, фе-

нилаланине и тирозине – 31,8%, аланине – 21,2%, аргинине – 19,6%, гистидине – 23,8%. В особенности идет активное поступление важных для организма спортсмена азотистых соединений, удовлетворяя потребность: в карнозине – на 19,5%, орнитине – на 435%, таурине – на 50%, цитруллине – на 96,6%. Важно, что одновременно происходит существенная компенсация организма: в кальции – на 44%, фосфоре – на 27,5%, клетчатке – на 72,15%, полифенолах – на 87,36%.

Таким образом, разработанный батончик является специализированным продуктом спортивного питания по основным функциональным ингредиентам.

Таблица 11. Функциональность аминокислот протеинового батончика

Table 11. Functionality of protein bar amino acids

Аминокислота	Адекватный уровень потребления, г/сутки	Верхний допустимый уровень потребления, г/сутки	Содержание в продукте, г/60 г	Процент удовлетворения
Незаменимые аминокислоты				
Валин	2,5	3,9	1,0	40,0
Изолейцин	2,0	3,1	0,9	45,0
Лейцин	4,6	7,3	1,7	36,9
Лизин	4,1	6,4	1,3	31,7
Метионин + цистин	1,8	2,8	0,6	33,3
Треонин	2,4	3,7	0,7	29,1
Триптофан	0,8	1,2	0,2	25,0
Фенилаланин+тирозин	4,4	6,9	1,4	31,8
Заменимые аминокислоты				
Аланин	6,6	10,6	1,4	21,2
Аргинин	6,1	9,8	1,2	19,6
Аспарагиновая кислота	12,2	19,5	0,3	2,40
Гистидин	2,1	3,4	0,5	23,8
Глицин	3,5	5,6	0,5	14,2
Глутаминовая кислота	13,6	21,8	0,8	5,80
Пролин	4,5	7,2	0,4	8,80
Серин	8,3	13,3	0,6	7,20
Другие соединения				
	мг/сутки	мг/сутки	мг	
Карнозин	200	2000	39,0	19,5
Орнитин	100	500	435,0	435,0
Таурин	400	1200	200,0	50,0
Цитруллин	100	500	96,6	96,6

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о перспективности безотходной переработки рыбной чешуи – недоиспользуемого

коллагенсодержащего сырья, путем комбинированного гидролиза (ферментализации с последующим термогидролизом) с получением функциональных пищевых биодобавок – пептидной и

белково-минеральной. Пептидная добавка является высокобелковым концентратом (98 г/100 г), содержащим все незаменимые аминокислоты при биологической ценности белка 59,9%. Белково-минеральная добавка характеризуется высоким содержанием минеральных веществ, особенно важных для спортсменов, – кальция (22,2 г/100 г) и фосфора (11,4 г/100 г). Входящие в ее состав непрогидролизированные белки являются пищевыми волокнами животного происхождения.

Обосновано использование полученных протеиновых биодобавок в спортивном питании в форме поликомпонентного протеинового батончика с применением вторичного растительного и рыбного сырья, на компоненты которого приходится 77% от его состава. Предлагаемый продукт является новым на рынке спортивного питания. Проведена оценка биопотенциала дополнительных пищевых компонентов, вводимых в рецептуру батончика (яблочные выжимки, льняной жмых, кедровые орехи) с целью оптимизации аминокислотного состава белковой части

продукта и формирования необходимой структуры и потребительских свойств.

Установлено наличие в растительных добавках ценных функциональных пищевых ингредиентов (жирные кислоты, витамины, полифенолы, клетчатки, пектина), повышающих сбалансированность батончика по биологически активным веществам и аминокислотную сбалансированность. Рассчитаны показатели биологической ценности белка в протеиновом батончике, свидетельствующие о его аминокислотной сбалансированности.

Поликомпонентный батончик массой 60 г является функциональным продуктом по содержанию таких аминокислот, как изолейцин, лейцин, валин, метионин и цистин, фенилаланин и тирозин, триптофан, лизин, треонин, аланин, аргинин, гистидин, глицин, карнозин, таурин, орнитин, цитруллин, а также кальция, фосфора, клетчатки и полифенолов и рекомендуется к употреблению спортсменам и всем людям, ведущим активный образ жизни.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Гаврилова Н. Б., Щетинин М. П., Молибога Е. А. Современное состояние и перспективы развития производства специализированных продуктов для питания спортсменов // Вопросы питания. 2017. Т. 86. N 2. С. 100–106.
2. Saura R. A., Rentero M. P. Z., Hernández J. M. Sports nutrition and performance (open access peer-reviewed chapter). In: Mózsic G., Figler M. (eds.) Nutrition in Health and Disease – Our Challenges Now and Forthcoming Time. 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84467>.
3. Latkov N. Yu, Vekovtsev A. A., Koshelev Yu. A., Bakaytis V. I. Relevant problems of sports nutrition // Foods and Raw materials. 2015. Vol. 3, no. 1. P. 77–85. <https://doi.org/10.12737/11241>.
4. Худяков М. С. Рынок спортивного питания // Сибирский торгово-экономический журнал. 2015. N 1 (20). С. 89–91.
5. Некрасова Ю. О., Мезенова О. Я. Батончики-снеки для спортивного питания: маркетинговое исследование и технология // Вестник молодежной науки. 2020. N 3 (25). С. 8. [https://doi.org/10.46845/2541-8254-2020-3\(25\)-8-8](https://doi.org/10.46845/2541-8254-2020-3(25)-8-8).
6. Мезенова О. Я., Мезенова Н. Ю., Байдалинова Л. С., Мерзель Й.-Т., Хелинг А. Биотехнология гейнеров для спортивного питания на основе активных пептидов рыбной чешуи // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова. 2014. Т. 10, N 1. С. 20–24.
7. Мезенова О. Я. Перспективы получения и использования протеинов из вторичного рыбного сырья // Вестник Международной академии холода. 2018. N 1. С. 5–10. <https://doi.org/10.17586/1606-4313-2018-17-1-5-10>.
8. Иванова Е. А., Якубова О. С. Анализ молекулярно-массового состава и свойств желатина и клея из чешуи рыб // Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение: труды Междунар. науч.-техн. конф. (Воронеж, 13–14 ноября 2014 г.). Воронеж: Изд-во Воронежского государственного университета инженерных технологий, 2014. Т. 1. С. 204–209.
9. Sionkowska A., Kozłowska J. Fish scales as a biocomposite of collagen and calcium salts // Key Engineering Materials. 2014. Vol. 587. P. 185–190. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.587.185>.
10. Пат. № 2681352, Российская Федерация. Способ получения пищевых добавок из вторичного рыбного сырья с применением гидролиза / С. В. Агафонова, Л. С. Байдалинова, В. В. Волков, Л. В. Городниченко, Т. Гримм, Н. Ю. Мезенова [и др.]; патентообладатель ООО «Биотех»; заявл. 31.01.2018; опубл. 06.03.2019. Бюл. № 7.
11. Мезенова Н. Ю., Байдалинова Л. С. Мезенова О. Я., Moersel J.-Т., Hoeling A. Активные пептиды рыбной чешуи в гейнерах для спортивного питания // Вестник Международной академии холода. 2014. N 2 (51). С. 47–52.
12. Хелинг А., Гримм Т., Волков В. В., Мезенова Н. Ю., Мезенова О. Я. Инновационное получение протеинов из белоксодержащего биологического сырья // Вестник науки и образования Северо-Запада России. 2017. Т. 3, N 2. С. 3–8. [Электронный ресурс]. URL: <http://vestnik-nauki.ru/wp-content/uploads/2017/08/2017-N2-Hoehling-Mezenova.pdf> (17.08.2021).
13. Wald M., Schwarz K., Rehbein H., Bußmann B., Beermann C. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin // Food Chemistry. 2016. Vol. 205. P. 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.041>.

org/10.1016/j.foodchem.2016.03.002.

14. Bader M., Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems // *Journal of Molecular Medicine*. 2008. Vol. 86, no. 6. P. 615–621. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0336-0>.

15. Bougateg A., Nedjar-Arroume N., Manni L., Ravallec-Ple R., Barkia A., Guillochon D., et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins // *Food Chemistry*. 2010. Vol. 118, no. 3. P. 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.021>.

16. Lucas J. A., Lucas P. R., Vogel S., Gamble G. D., Evans M. C., Reid I. R. Effects of sub elite competitive running on bone density, body composition and sexual maturity of adolescent females // *Osteoporosis International*. 2003. Vol. 14, no. 10. P. 848–856. <https://doi.org/10.1007/s00198-003-1455-7>.

17. Watkins J. Fundamental biomechanics of sport and exercise. 2014. 664 p. <https://doi.org/10.4324/9780203066461>.

18. Pati F., Datta P., Adhikari B., Dhara S., Ghosh K., Das Mohapatra P. K. Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility // *Journal of biomedical materials research*. 2012. Vol. 100A, no. 4. P. 1068–1079. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33280>.

19. Yamada S., Nagaoka H., Terajima M., Tsuda N., Hayashi Y., Yamauchi M. Effects of fish collagen peptides on collagen post-translational modifications and mineralization in an osteoblastic cell culture system // *Dental Materials Journal*. 2013. Vol. 32, no. 1. P. 88–95. <https://doi.org/10.4012/dmj.2012-220>.

20. Громова О. А., Торшин И. Ю., Томилова И. К., Гилельс А. В. Кальций и биосинтез коллагена: систематический анализ молекулярных механизмов воздействия // *Лечащий врач*. 2016. N 9. С. 96–103.

21. Kunstel K. Calcium requirements for the athlete // *Current Sports Medicine Reports*. 2005. Vol. 4, no. 4. P. 203–206. <https://doi.org/10.1097/01.csmr.0000306208.56939.01>.

22. Мезенова О. Я., Байдалинова Л. С., Волков В. В., Агафонова С. В., Мезенова Н. Ю., Казмирова Е. А. Обоснование рациональных параметров гидролиза коллагенсодержащего высокоминерализованного копченого рыбного сырья // *Известия вузов. Пищевая технология*. 2019. N 4 (370). С. 46–50.

23. Figueroa A., Wong A., Jaime S.J. Influence of L-citrulline and watermelon supplementation on vascular function and exercise performance // *Current opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2017. Vol. 20, no. 1. P. 92–98. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000340>.

24. Sale C., Artioli G. G., Gualano B., Saunders B.,

Hobson R. M., Harris R. C. Carnosine: from exercise performance to health // *Amino Acids*. 2013. Vol. 44, no. 6. P. 1477–1491. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1476-2>.

25. Huxtable R. J. Physiological actions of taurine // *Physiological Reviews*. 1992. Vol. 72, no. 1. P. 101–164. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.101>.

26. Muthukumaran S., Jaidev J., Umashankar V., Sulochana K. N., Ornithine and its role in metabolic disease // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017. Vol. 86. P. 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.024>.

27. Иорданская Ф. А., Цепкова Н. К. Кальций в крови: диагностическое и прогностическое значение в мониторинге функционального состояния высококвалифицированных спортсменов // *Вестник спортивной науки*. 2009. N 3. С. 33–35.

28. Иорданская Ф. А., Цепкова Н. К. Фосфор в крови: диагностическое и прогностическое значение в мониторинге функционального состояния высококвалифицированных спортсменов // *Вестник спортивной науки*. 2011. N 4. С. 30–33.

29. Kruczek M., Gumul D., Kačániová M., Ivanišková E., Mareček J., Gambuś H. Industrial Apple Pomace by-products as a Potential Source of Pro-health Compounds in Functional Food // *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2017. Vol. 7, no. 1. P. 22–26. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.7.1.22-26>.

30. Rana S., Gupta S., Rana A., Bhushan S. Functional properties, phenolic constituents and antioxidant potential of industrial apple pomace for utilization as active food ingredient // *Food Science and Human Wellness*. 2015. Vol. 4, no. 4. P. 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.10.001>.

31. Sicilia T., Niemeyer H. B., Honig D. M., Metzler M. Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. Vol. 51, no. 5. P. 1181–1188. <https://doi.org/10.1021/jf0207979>.

32. Toure A., Xueming X. Flaxseed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components, and health benefits // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010. Vol. 9, no. 3. P. 261–269. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00105.x>.

33. Егорова Е. Ю., Позняковский В. М. Пищевая ценность кедровых орехов Дальневосточного Востока // *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2010. N 4 (316). С. 21–23.

34. Колесникова Т. Г., Субботина М. А., Шубенкина Н. С. Исследование химического состава белково-липидного продукта из кедровых орехов // *Техника и технология пищевых производств*. 2013. N 2 (29). С. 22–25.

REFERENCES

1. Gavrilova N. B., Shchetinin M. P., Moliboga E. F. Modern state and prospects of the development of production of specialized foodstuffs for athletes. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 2017;86(2):100–106. (In Russian).
2. Saura R. A., Rentero M. P. Z., Hernández J. M. Sports nutrition and performance (open access peer-reviewed chapter). In: Mózsic G., Figler M. (eds.) *Nutrition in Health and Disease – Our Challenges Now and Forthcoming Time*. 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84467>.
3. Latkov N. Yu., Vekovtsev A. A., Koshelev Yu. A., Bakaytis V. I. Relevant problems of sports nutrition. *Foods and Raw materials*. 2015;3(1):77–85. <https://doi.org/10.12737/11241>.
4. Khudyakov M. S. Sports nutrition market. *Sibirskii torgovo-ekonomicheskii zhurnal*. 2015;1(20):89–91. (in Russian).
5. Nekrasova Yu. O., Mezenova O. Ya. Barsnack for sports nutrition: marketing research and technology. *Vestnik molodezhnoi nauki*. 2020;3:8. (In Russian). [https://doi.org/10.46845/2541-8254-2020-3\(25\)-8-8](https://doi.org/10.46845/2541-8254-2020-3(25)-8-8).
6. Mezenova O. Y., Mesenova N. Y., Baydalina L. S., Moersel J.-T., Hoeling A. Biotechnological production of gainers for sports nutrition, based on active peptides of fish scales. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoi biologii imeni Yu. A. Ovchinnikova = Yu. A. Ovchinnikov bulletin of biotechnology and physical and chemical biology*. 2014;10(1):20–24. (In Russian).
7. Mesenova N. Yu. Prospects for producing and using proteins from secondary fish raw materials. *Vestnik Mezhdunarodnoi akademii kholoda = Journal of International Academy of Refrigeration*. 2018;1:5–10. (In Russian). <https://doi.org/10.17586/1606-4313-2018-17-1-5-10>.
8. Ivanova E. A., Yakubova O. S. Analysis of the molecular weight composition and properties of gelatin and glue from fish scales. In: *Prodovol'stvennaya bezopasnost': Nauchnoe, kadrovoe i informatsionnoe obespechenie: trudy Mezhdunarodnoi nauchno-tekhnicheskoi konferentsii = Food security: Scientific, personnel and information support: Proceedings of International Scientific and Technical Conference*. 13–14 November 2014, Voronezh. Voronezh: Izdatel'stvo Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologii; 2014. vol. 1, p. 204–209. (In Russian).
9. Sionkowska A., Kozłowska J. Fish scales as a biocomposite of collagen and calcium salts. *Key Engineering Materials*. 2014;587:185–190. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.587.185>.
10. Agafonova S. V., Bajdalina L. S., Volkov V. V., Gorodnichenko L. V., Grimm T., Mezenova N. Yu., et al. *Method of obtaining food additives from secondary fish raw materials using hydrolysis*. Patent RF, no. 2681352; 2018. (In Russian).
11. Mesenova N. Yu., Baydalina L. S., Mezenova O. Ya., Moersel J.-T., Hoeling A. Active peptides of fish scale in gainers for sports nutrition. *Vestnik Mezhdunarodnoi akademii kholoda = Journal of International Academy of Refrigeration*. 2014;2:47–52. (In Russian).
12. Hoehling A., Grimm T., Volkov V., Mezenova O., Mezenova N. Innovative protein extracting from protein containing biological raw materials. *Vestnik nauki i obrazovaniya Severo-Zapada Rossii = Journal of Science and Education of North-West Russia*. 2017;3(2):3–8. Available from: <http://vestnik-nauki.ru/wp-content/uploads/2017/08/2017-N2-Hoehling-Mezenova.pdf> [17th August 2021]. (In Russian).
13. Wald M., Schwarz K., Rehbein H., Bußmann B., Beermann C. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. *Food Chemistry*. 2016;205:221–228. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.002>.
14. Bader M., Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *Journal of Molecular Medicine*. 2008;86(6):615–621. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0336-0>.
15. Bougatef A., Nedjar-Arroume N., Manni L., Ravallec-Ple R., Barkia A., Guillochon D., et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*. 2010;118(3):559–565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.021>.
16. Lucas J. A., Lucas P. R., Vogel S., Gamble G. D., Evans M. C., Reid I. R. Effects of sub elite competitive running on bone density, body composition and sexual maturity of adolescent females. *Osteoporosis International*. 2003;14(10):848–856. <https://doi.org/10.1007/s00198-003-1455-7>.
17. Watkins J. *Fundamental biomechanics of sport and exercise*. London: Routledge; 2014. 664 p. <https://doi.org/10.4324/9780203066461>.
18. Pati F., Datta P., Adhikari B., Dhara S., Ghosh K., Das Mohapatra P. K. Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. *Journal of biomedical materials research*. 2012;100A(4):1068–1079. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33280>.
19. Yamada S., Nagaoka H., Terajima M., Tsuda N., Hayashi Y., Yamauchi M. Effects of fish collagen peptides on collagen post-translational modifications and mineralization in an osteoblastic cell culture system. *Dental Materials Journal*. 2013;32(1):88–95. <https://doi.org/10.4012/dmj.2012-220>.
20. Gromova O. A., Torshin I. Yu., Tomilova I. K., Gile's A. V. Calcium and collagen biosynthesis: systematic analysis of molecular mechanisms of effect. *Lechashchii vrach = Lechaschi Vrach Journal*. 2016;9:96–103. (In Russian).
21. Kunstel K. Calcium requirements for the athlete. *Current Sports Medicine Reports*. 2005;4(4):203–206.

<https://doi.org/10.1097/01.csmr.0000306208.56939.01>.

22. Mezenova O. Ya., Baydalinova L. S., Volkov V. V., Agafonova S. V., Mezenova N. Yu., Kazimirova E. A. Justification of rational parameters of hydrolysis of collagen-containing highly mineralized smoked fish raw. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Pishchevaya tekhnologiya = News of Institutes of higher Education. Food Technology*. 2019;4:46–50. (In Russian).

23. Figueroa A., Wong A., Jaime S.J. Influence of L-citrulline and watermelon supplementation on vascular function and exercise performance. *Current opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2017;20(1):92–98. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000340>.

24. Sale C., Artioli G. G., Gualano B., Saunders B., Hobson R. M., Harris R. C. Carnosine: from exercise performance to health. *Amino Acids*. 2013;44(6):1477–1491. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1476-2>.

25. Huxtable R. J. Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews*. 1992;72(1):101–164. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.101>.

26. Muthukumar S., Jaidev J., Umashankar V., Sulochana K. N., Ornithine and its role in metabolic disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;86:185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.024>.

27. Iordanskaya F. A., Tsepkova N. K. Calcium in the blood: diagnostic and prognostic value for functional state monitoring in elite athletes. *Vestnik sportivnoi nauki = Sports science bulletin*. 2009;3:33–35. (In Russian).

28. Iordanskaya F. A., Tsepkova N. K. Blood phosphorus: diagnostic and prognostic value for functional state monitoring in elite athletes. *Vestnik sportivnoi nauki = Sports science bulletin*. 2011;4:

30–33. (In Russian).

29. Kruczek M., Gumul D., Kačániová M., Ivanišková E., Mareček J., Gambuś H. Industrial Apple Pomace by-products as a Potential Source of Pro-health Compounds in Functional Food. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2017;7(1):22–26. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.7.1.22-26>.

30. Rana S., Gupta S., Rana A., Bhushan S. Functional properties, phenolic constituents and antioxidant potential of industrial apple pomace for utilization as active food ingredient. *Food Science and Human Wellness*. 2015;4(4):180–187. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.10.001>.

31. Sicilia T., Niemeyer H. B., Honig D. M., Metzler M. Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(5):1181–1188. <https://doi.org/10.1021/jf0207979>.

32. Toure A., Xueming X. Flaxseed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components, and health benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010;9(3):261–269. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00105.x>.

33. Egorova E. Yu., Poznyakovskiy V. M. Alimentary value of the Far East cedar nuts. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Pishchevaya tekhnologiya = News of Institutes of higher Education. Food Technology*. 2010;4:21–23. (In Russian).

34. Kolesnikova T. G., Subbotina M. A., Shubenkina N. S. Study on the chemical composition of the protein-lipid product of pine nuts. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv = Food Processing: Techniques and Technology*. 2013;2:22–25. (In Russian).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ю. О. Некрасова,
аспирант,
Калининградский государственный
технический университет,
236022, г. Калининград, Советский пр-т, 1,
Российская Федерация,
yulya.nekrasova.1998@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4946-5971>

О. Я. Мезенова,
д.т.н., профессор, заведующая кафедрой
пищевой биотехнологии,
Калининградский государственный
технический университет,
236022, г. Калининград, Советский пр-т, 1,
Российская Федерация,
mezenova@klgtu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4716-2571>

Й.-Т. Мерзель,
д.естественных н.,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yuliya O. Nekrasova,
Postgraduate Student,
Kaliningrad State Technical University,
1, Sovetskii Ave., Kaliningrad, 236022,
Russian Federation,
yulya.nekrasova.1998@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4946-5971>

Olga Ya. Mezenova,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Head of the Department
of Food Biotechnology,
Kaliningrad State Technical University,
1, Sovetskii Ave., Kaliningrad, 236022,
Russian Federation,
mezenova@klgtu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4716-2571>

Joerg-Thomas Moersel,
Dr. Sci. (Natural Sciences),

генеральный директор,
Научно-исследовательская
и консультационная лаборатория UBF,
15345, г. Альтландсберг, An der Mühle, 1,
Германия,
thomas.moersel@ubf-research.com
<https://orcid.org/0000-0002-5760-1144>

Director General,
UBF-Untersuchungs-, Beratungs-,
Forschungslaboratorium GmbH;
1, An der Mühle, Altlandsberg, 15345,
Germany,
thomas.moersel@ubf-research.com
<https://orcid.org/0000-0002-5760-1144>

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.*

Информация о статье

*Поступила в редакцию 31.08.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.*

Information about the article

*The article was submitted 31.08.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.*

Научная статья

УДК 579.22

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-617-626>



Процессы агглютинации культур активного ила под действием внеклеточных лектинов

Алексей Витальевич Кобелев, Святослав Владимирович Клементьев,
Александр Семенович Сироткин

*Казанский национальный исследовательский технологический университет,
г. Казань, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Кобелев Алексей Витальевич, alexei-ksu@mail.ru

Аннотация. Цель исследования – изучить агглютинирующую способность пяти изолятов – A1, A2, A3, A4, BS1, выделенных из активного ила на селективных средах, характерных для ряда микробных культур, доминирующих в активном иле и участвующих в процессах формирования микробных агрегатов. Изучены морфологические свойства выделенных изолятов и их лектиновая активность, физиолого-биохимические свойства отдельных изолятов, осуществлена идентификация микроорганизмов в их составе. Оценена способность к синтезу экзополисахаридного матрикса у выбранных изолятов, а также седиментация активного ила под действием компонентов нативного раствора и культуральной жидкости изолята BS1. По результатам оценки способности к агглютинации для дальнейшей работы были выбраны изоляты BS1 и A2 в качестве продуцентов внеклеточных лектинов и объектов агглютинации соответственно. Физиолого-биохимические свойства и молекулярно-генетическая идентификация изолята BS1 позволила установить степень идентичности 96,19% с известными культурами *p. Bacillus*; для изолята A2 была зарегистрирована степень идентичности 92,93% с известными культурами *p. Shigella* и *p. Escherichia*. Для оценки способности к синтезу матрикса биопленки изоляты BS1 и A2 выращивались на агаризованной питательной среде с добавлением красителя конго красного. Полученные результаты показали, что изоляты способны синтезировать экзополисахаридный матрикс, который является основным компонентом бактериальных биопленок. Результаты изучения процессов седиментации активного ила под влиянием нативного раствора и культуральной жидкости изолята BS1 показали, что скорость седиментации активного ила значительно увеличивалась при внесении суспензии клеток изолята BS1 в начальный период седиментации, а при внесении нативного раствора изолята BS1 – по истечении 5 мин контакта. Полученные экспериментальные данные позволяют предложить использование сред – источников внеклеточных лектинов бактерий, в качестве коагулянта (флокулянта) для седиментации активного ила.

Ключевые слова: лектины, микробные изоляты, активный ил, матрикс биопленки, агглютинация, седиментация

Для цитирования: Кобелев А. В., Клементьев С. В., Сироткин А. С. Процессы агглютинации культур активного ила под действием внеклеточных лектинов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 617–626. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-617-626>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Agglutination processes of activated sludge cultures induced by extracellular lectins

Alexei V. Kobelev, Svyatoslav V. Klement'ev,
Alexander S. Sirotkin

Kazan National Research Technological University,
Kazan, Russian Federation

Corresponding author: Alexei V. Kobelev, alexei-ksu@mail.ru

Abstract. We examine the agglutinating ability of five compounds, namely, A1, A2, A3, A4 and BS1, isolated from activated sludge on selective media typical of a number of dominant microbial cultures that contribute to

the formation of microbial aggregates. The morphological properties of the isolates and their lectin activity, as well as the physiological and biochemical properties of individual isolates were studied; microorganisms in their composition were identified. We assessed the capacity of the isolates under study to synthesize an exopolysaccharide matrix, as well as the sedimentation of activated sludge under the action of the native solution and culture liquid of the BS1 isolate. Based on their capacity to agglutinate, the BS1 and A2 isolates were selected for further research as producers of extracellular lectins and objects of agglutination, respectively. The biophysicochemical properties and molecular-genetic identification of the BS1 isolate allowed the degree of identity with *r. Bacillus* to be defined (96.19%); for the A2 isolate, 92.93% identity with *p. Shigella* and *p. Escherichia* was determined. To assess the capacity to synthesize a biofilm matrix, the BS1 and A2 isolates were cultivated on an agar nutrient solution using Congo Red dye. According to the obtained results, the isolates are capable of synthesizing an exopolysaccharide matrix, the main component of bacterial biofilms. The research results on the sedimentation of activated sludge induced by the native solution and culture liquid of BS1 showed the following. The sedimentation rate of activated sludge increased significantly at the beginning of the process upon adding a BS1 cell suspension, while the introduction of the native solution of BS1 intensified the process following 5 minutes of contact. The obtained experimental data suggest that the media containing extracellular bacterial lectins can be effectively used as a coagulant (flocculant) for the sedimentation of activated sludge.

Keywords: lectins, microbial isolates, activated sludge, biofilm matrix, agglutination, sedimentation

For citation: Kobelev A. V., Klement'ev S. V., Sirotkin A. S. Agglutination processes of activated sludge cultures induced by extracellular lectins. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):617-626. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-617-626>.

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая трансформация загрязняющих веществ играет важную роль в процессах биологической очистки сточных вод сообществом агрегированных микроорганизмов в виде суспензии активного ила, а также иммобилизованной биомассы в виде биопленки. В формировании биопленки в свою очередь очень важны лектины, необходимые для правильной архитектуры и прочности биопленки, они отвечают за связывание микробных клеток между собой и/или с поверхностью для иммобилизации, [1].

Лектины – это гликопротеины, способные связывать углеводные остатки на поверхности клетки, вызывая их агглютинацию [2, 3]. Было обнаружено, что эти белки присутствуют в любой живой системе от вирусов до человека и играют фундаментальную роль в процессах углевод-белкового узнавания в организме хозяина и микробных сообществ в целом [4, 5]. В настоящее время особый интерес вызывают лектины, синтезируемые бактериями, в связи с перспективой использования их в различных медико-биологических, биотехнологических и исследовательских задачах.

В литературе имеются данные об использовании растительных материалов в качестве природных коагулянтов [6], примером которых являются семена, богатые лектинами. Однако затраты на получение очищенных растительных лектинов довольно существенны. Ввиду этого очевидный интерес представляет изучение микробных лектинов.

Цель данной работы состояла в изучении агглютинирующей способности микробных культур, выделенных из активного ила. В процессе ис-

следования решались следующие задачи:

1. Получение изолятов сообщества активного ила очистных сооружений г. Зеленодольск, Республика Татарстан.
2. Анализ культурально-морфологических признаков полученных изолятов и оценка активности внеклеточных лектинов культур в их составе.
3. Идентификация микроорганизмов в составе изолятов, проявивших наибольшую способность к агглютинации клеток, и исследование их физиолого-биохимических свойств.
4. Визуализация реакции бактериальной агглютинации с выбранными образцами.
5. Оценка способности идентифицированных изолятов к синтезу экзополисахаридного матрикса биопленки.
6. Анализ эффективности бактериальных лектинов отдельных культур в качестве коагулянта (флокулянта) для седиментации активного ила.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования были рассмотрены:

- активный ил биологических очистных сооружений г. Зеленодольск по очистке коммунально-бытовых сточных вод и выделенные из его сообщества изоляты A1, A2, A3, A4, а также изолят культуры *Bacillus subtilis* (BS1);
- культура *Bacillus subtilis*, выделенная из лекарственного препарата Споробактерин (ООО «Бакорен», Россия).

Выделенные изоляты и препаративные культуры представляли интерес для исследования агглютинации на основании их распространенности в микробном сообществе активного ила, а также их участия в процессах агглютинации клеток на осно-

вании ранее полученных данных [7, 8].

Изолят BS1 и культура *Bacillus subtilis* рассматривались в качестве продуцентов внеклеточных лектинов.

Клетки бактерий изолятов A1, A2, A3, A4 рассматривались в качестве объектов агглютинации.

Методы исследования. Получение чистых культур изолятов осуществляли высевом на плотные питательные среды суспензии активного ила методом Дригальского¹.

Для выделения изолятов A1, A2, A3, A4 использовали селективную синтетическую питательную среду Фенилаланин агар [9], характерную для накопления культур р. *Acinetobacter*, состав которой представлен в табл. 1.

Таблица 1. Состав питательной среды «Фенилаланин агар» для накопления культур рода *Acinetobacter*

Table 1. "Phenylalanine agar" medium composition for genus *Acinetobacter* accumulation

Компонент	Концентрация, г/л
L-Фенилаланин	2,0–3,0
NaCl	5,0
Na ₂ SO ₄	2,0
KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	2,5
MgSO ₄	0,1
Агар микробиологический	15,0

Основной селективный фактор данной питательной среды – L-фенилаланин, являющийся единственным источником азота и углерода.

Получение изолята BS1, содержащего клетки спорообразующей *Bacillus subtilis*, осуществляли на мясопептонном агаре. Суспензию активного ила предварительно прогревали при температуре 70 °С в течении 45 мин для обеспечения лизиса вегетативных клеток [10, 11].

Физиолого-биохимические свойства бактерий изучали согласно стандартным методикам, также представленным в «Практикуме по микробиологии»¹. Подвижность клеток определяли приготвлением препарата «висячая капля»¹.

Молекулярно-генетическую идентификацию микроорганизмов осуществляли путем определения нуклеотидной последовательности 16S рРНК с использованием стандартных праймеров 72s (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') [12, 13]. Процедура идентификации проводилась на базе Института экологии и природопользования, а также на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского (Приволжского) федерального университета.

Данная процедура проводилась в два этапа:

1. Выделение бактериальной геномной ДНК.

2. Секвенирование по методу Сэнгера.

Выделение бактериальной геномной ДНК проводили с помощью набора реагентов FastDNA Spin Kit For Soil². Клетки и органеллы подвергали механическому разрушению, для чего 0,3 г биомассы бактерий суспендировали в натриево-фосфатном буфере и МТ-буфере, после переносили в гомогенизатор (30 с, 1500 об./мин) и центрифугировали (5 мин, 14000 об./мин). В осадке оставались крупные внутриклеточные органеллы, обломки клеток и полуразрушенные бактерии, ДНК оставалась в супернатанте. Для осаждения белков к отобранному супернатанту, содержащему ДНК, добавляли 250 мкл раствора PPS (PPS Silent Surfactant), перемешивали и центрифугировали (5 мин, 14000 об./мин).

Закрепление ДНК на матриксе проводили следующим образом: осадок отбрасывали, полученный супернатант смешивали с 1 мл Binding Matrix и перемешивали на ротаторе в течение 10 мин. Далее проводили закрепление ДНК на колонке Spin. Для этого 600 мкл полученного раствора переносили на колонку Spin и центрифугировали (1 мин, 14000 об./мин) до тех пор, пока весь исследуемый раствор не будет израсходован.

ДНК очищали от реактивов и клеточных остатков путем использования 500 мкл раствора гуанидин-тиоционата, который помещали на колонку и центрифугировали (1 мин, 11000 об./мин). Полученную надосадочную жидкость отбрасывали. На колонку помещали 500 мкл SEWS-M и центрифугировали (1 мин, 14000 об./мин) при комнатной температуре. Для удаления SEWS-M и других реактивов жидкость со дна пробирки удаляли и центрифугировали колонку (2 мин, 14000 об./мин) при комнатной температуре. Полученную колонку с очищенными ДНК/РНК помещали в чистую пробирку Eppendorf и оставляли сохнуть на воздухе в течение 5 мин. Затем в середину колонки аккуратно добавляли 50 мкл DES (апирогенная вода без ДНКазы) и центрифугировали (1 мин, 14000 об./мин) при комнатной температуре для сбора элюата в пробирке.

Определение первичных нуклеотидных последовательностей ДНК проводили с помощью секвенирования по методу Сэнгера³. Постановка сиквенсной реакции проводилась с использованием ген-специфических праймеров и набора реактивов Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) в объеме 10 мкл. Для подтверждения мутации прочтение осуществлялось с обоих праймеров – прямого и обратного. Реакцию проводили, используя амплификатор Veriti (Applied Biosystems, США) по

¹Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. Практикум по микробиологии. М.: ИЦ «Академия»: 2005. 608 с.

²FastDNA SPIN Kit for Soil. URL: http://dmoserv3.who.edu/data_docs/IODP_347/FastDNA_Spin_Kit_for_Soil (29.07.2021).

³BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_081527.pdf (29.07.2021).

следующему температурному протоколу: предварительная денатурация – при температуре 96 °С (1 мин); 26 циклов при температуре: 96 °С (10 с), 50 °С (5 с), 60 °С (4 мин).

Очистка сиквенсной реакции осуществлялась в следующей последовательности:

1) в пробирку с ПЦР-продуктом добавляли по 40 мкл смеси ацетата аммония с этанолом на каждые 10 мкл ПЦР-смеси;

2) пробирки вортексировали и инкубировали смесь при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин;

3) после пробы центрифугировали 30 мин при 2500 об./мин;

4) полученный супернатант аккуратно удаляли, осадок промывали 150 мкл охлажденного 80%-го этанола с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 2500 об./мин;

5) этанол удаляли, осадок высушивали при температуре 55 °С в амплификаторе и растворяли в 10 мкл Hi-Di-формамида;

6) перед секвенированием пробы денатурировали в течение 2 мин при 95 °С;

7) детекция продуктов секвенирования проводилась в автоматическом режиме методом капиллярного электрофореза на приборе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, США).

Полученные результаты сравнивали с базой данных NCBI с помощью пакета программ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Определения лектиновой активности проводили путем периодического культивирования микроорганизмов в аэробных условиях при температуре 37 °С в течение 18 ч. В качестве питательной среды использовали мясопептонный бульон. После активации микробные суспензии центрифугировали при 8000 об./мин в течение 10 мин.

Нативный раствор (н.р.) изолята BS1 и *Bacillus subtilis* для реакции агглютинации получали путем центрифугирования культуральной жидкости при 10000 об./мин в течение 30 мин.

Бактериальные клетки, оставшиеся после первого центрифугирования, трижды отмывали в физиологическом растворе при 8000 об./мин, в течение 10 мин, а затем доводили до 2%-й суспензии клеток и использовали в дальнейшем эксперименте.

Реакцию агглютинации проводили в специальных планшетах для иммунологических реакций с U-образными лунками: в лунках планшета готовили серию последовательных разведений нативного раствора по 0,05 мл, затем в каждую лунку добавляли 0,05 мл 2%-й суспензии бактериальных клеток, реакцию проводили при 24 °С в течение 2 ч.

Активность лектинов выражали как максимальное разведение лектинов, при котором

наблюдается агглютинация бактериальных клеток. Расчет полученных результатов проводили по формуле $AG = 2^{n-1}$, где AG – агглютинирующая активность (титр, единицы), n – разведение (лунка), при котором наблюдается агглютинация бактериальных клеток [14].

Оценка способности бактерий к синтезу экзополисахаридного матрикса. Способность культур к выделению экзополисахаридного матрикса оценивали с помощью методики, предложенной D. J. Freeman [15]. Для этого анализируемые штаммы выращивали на поверхности плотной питательной среды, помимо основных питательных компонентов содержащей специфический краситель конго красный. Образование матрикса оценивали по цвету выросших колоний. Согласно данному методу, отсутствие матрикса определяется по белому цвету колоний, умеренная способность к синтезу матрикса – по красным колониям, выраженная способность – по черному цвету колоний [16].

Седиментация активного ила. Исследования проводились в цилиндре объемом 100 мл, диаметром 60 мм и высотой столба жидкости 135 мм. Седиментация ила описывалась кривыми Кинша [17] с фиксированием границы раздела вода–ил. Данные измерений заносились в таблицу, а затем отображались графически.

Для каждого временного промежутка рассчитывалась скорость осаждения (скорость седиментации) активного ила по регистрации границы раздела фаз в цилиндре в рассматриваемый момент времени.

Скорость осаждения активного ила, u , мм/мин, для каждого временного промежутка рассчитывалась по формуле:

$$u = \frac{H_1 - H_2}{\Delta T},$$

где H_1-H_2 — разница высот границы раздела ил–вода на рассматриваемом временном участке, мм; ΔT — продолжительность временного участка между высотами H_1 и H_2 , мин.

Седиментационные свойства ила исследовались для дозы (концентрации) ила 2,9 г/л.

Дозу ила определяли по методике ФР 1.31.2008.04398⁴.

Для исследования процесса седиментации под действием внеклеточных лектинов использовались следующие образцы:

– активный ил биологических очистных сооружений г. Зеленодольск (100 мл) в качестве контроля;

– контроль (98 мл) + нативный раствор BS1 (2 мл);

– контроль (98 мл) + нативный раствор *Bacillus subtilis* (2 л);

⁴ФР 1.31.2008.04398. Методика выполнения измерений дозы ила по объему и расчету илового индекса [Электронный ресурс]. URL: <https://meganorm.ru/Index2/1/4293790/4293790509.htm> (29.07.2021).

– контроль (98 мл) + суспензия BS1 (2 мл);
– контроль (98 мл) + суспензия *Bacillus subtilis* (2 мл).

Объем вносимых в активный ил нативного раствора и суспензии – 2 мл, был выбран согласно предварительным исследованиям.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Культурально-морфологические свойства выделенных изолятов и оценка их лектиновой активности. Клетки изолята A1 представляют собой грамотрицательные кокки, которые на агаризованных средах образуют круглые колонии диаметром 2 мм, при культивировании на жидкой питательной среде образуют пленку. Спор не образуют.

Клетки изолята A2 представляют собой грамотрицательные кокки. На поверхности плотных агаризованных сред образуют круглые белые колонии диаметром 2 мм. При культивировании в жидкой питательной среде на стенках колбы образуют белую пленку. Спор не образует, клетки неподвижны.

Изолят A3 содержит грамотрицательные палочки. На плотных агаризованных средах образуют колонии желтого цвета диаметром 3–4 мм. При культивировании в жидких средах пленку не образуют. Спор не образуют.

Клетки изолята A4 представляют собой грамположительные кокки, расположенные преимущественно гроздьями. На плотных питательных средах образуют круглые колонии с ровными краями диаметром 2–3 мм. При культивировании на жидких питательных средах образуют едва заметную пленку, на дне присутствует осадок.

Клетки изолята BS1 – грамположительные палочки. Колонии бесцветные, мелкоморщинистые. Образуют споры, подвижны.

Согласно результатам экспериментальных исследований активности лектинов культуры BS1 к клеткам исследуемых изолятов было показано, что нативный раствор изолята BS1 (как источник внеклеточных лектинов) проявлял наибольшую активность к клеткам изолятов A2 (AG=2 ед.) и A4 (AG=2 ед.). Выявлена низкая лектиновая активность к клеткам изолята A1 (AG=1 ед.) и отсутствие активности к клеткам изолята A3 (AG=0 ед.). Невыраженную активность к клеткам изолята A3 можно объяснить отсутствием углеводных детерминантов, специфичных для внеклеточных лектинов BS1.

Нативный раствор модельной культуры *Bacillus subtilis* показал слабую активность внеклеточных лектинов к клеткам изолята A4 (AG=1 ед.). Отсутствие активности к остальным культурам связана, вероятно, с неспецифиче-

скими для лектинов углеводными остатками на поверхности клеток.

На основе морфологических признаков для дальнейшей идентификации были выбраны изоляты A2 и BS1, полученные из активного ила: клетки изолята A2 выбраны в качестве объекта агглютинации, изолят BS1 – в качестве продуцента внеклеточных лектинов.

Физиолого-биохимические свойства изолятов A2 и BS1 и идентификация микроорганизмов в их составе. Основные физиолого-биохимические свойства культур A2 и BS1 показаны в табл. 2.

Таблица 2. Физиолого-биохимические свойства изолятов A2 и BS1

Table 2. Physiological and biochemical properties of isolates A2 and BS1

Свойства	Изоляты	
	A2	BS1
Наличие фермента каталазы	+	+
Гидролиз желатина	-	+
Гидролиз крахмала	-	+
Наличие фермента уреазы	+	+
Рост при 3% NaCl	+	+
Рост при 7% NaCl	-	+
Тест Форега-Проскауэра	-	+
Выделение NH ₃ при гидролизе белков	+	+
Выделение H ₂ S при гидролизе белков	-	+

Примечание. «+» – реакция положительная, «-» – реакция отрицательная.

На основании морфологических признаков и физиолого-биохимических свойств культуру изолята A2 можно отнести к бактериям рода *Acinetobacter*, а BS1 – к роду *Bacillus*⁵.

Результаты процедуры секвенирования исследуемых образцов показали, что 16S рРНК изолятов A2 и BS1 содержит 1214 и 1256 пар нуклеотидов соответственно (табл. 3).

Идентификация нуклеотидной последовательности фрагментов изолята A2 в международной базе позволила установить степень идентичности 92,93% с известными культурами р. *Shigella* и р. *Escherichia*; по отношению к изоляту BS1 была зарегистрирована степень идентичности 96,19% с известными культурами р. *Bacillus* (табл. 4).

Согласно молекулярно-генетической экспертизе, изолят A2 можно отнести к различным видам рода *Shigella* или рода *Escherichia* либо к их смеси, а изолят BS1 можно отнести к различным видам рода *Bacillus* либо к их смеси.

⁵Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. Определитель бактерий Берджи: в 2 т.; 9-е изд.; пер. с англ. под ред. Г. А. Заварзина. М.: Мир. 1997. 800 с.

Таблица 3. Нуклеотидная последовательность 16S рРНК изолятов А2 и BS1

Table 3. Nucleotide sequence of 16S rRNA isolates A2 and BS1

A2	AAACGGTAGCTAATACCGCATAACCTCGCAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGT GCCCAGATGGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCTCACCAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA TGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT GGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTACGCGGGG AGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTACTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCAGGCTACCTCGTGCCA GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTG TTAAGTCATGATAGTGAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTA GAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGGTGGCGAAGGCG GTCCCTTGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGTAGTC CACGCCGTAAACGATGTCGACTTGCAAGTTGTGCTCTTGAGGCGTGGCTTCCAGAGCTAATGCGTTAAGTCGA CCGCTTGCGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACCTCAATGAATTGACGGCGGCCCGCACCAGCTGTGGAGCAT GTAGTTCAATCGAATGCTAGCGCGAAGCAGCTTAAGTGGTCTGGACAATCCAACGAAAGTTCCAGAGCATGGA TATTGTGCCTATCGGTAATCGGTGAGAACAGGTGACCTGCATGGCTGTCTCAAGCTTCTGGTATGATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTG CCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTCTCCAGGGCAACACACGT TCTTCAATGGGGCATACAAGAGAAGCGCCCTCGCGAGATCAAGCCGACCTCATAAAGAGCGCAGTAGTCCC GATGGTCTCTCAACTCTCTCCATGAAGTCGGGGTCGCTAGTAATGTTCTCTAG
BS1	TGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGG CTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGCAAC GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCGAGACTCCACGGGAGG CAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGCTTTTCG GGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATTAAGCTGGCAGCTTGACGGTACCTAACCC AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG GGCGTAAAGGGCGCCGCGCAGGTGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA TTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT ATGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGCACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGCAAGCGTGGGGAG CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGTTTCCGCCCTT TAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCGCTGGAGGAGTACGGCTCGCAGGCTGAACCTCCAAAGGAAT TTGACCGCGGGCCCGCCACAGCCGGTTGGTAGCATGATGGATTTAGTCGACGTCCACCGCCGTAACGAACCT TTACCCAGTCTTACATCCCTCTGAAACTCCTAGAGAATTAGGGCTTCCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGT GGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTT AGTTGCCATTAAGTTGGGCACTTAAGGTGAGTACGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGAGTACGTC AAATCATCATGTCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCG AGCTAGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGATAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATC GCTAGTAATCGCGGATCAGCATG

Таблица 4. Сравнение секвенированных нуклеотидных последовательностей фрагментов 16S РНК с известными данными в базе международного банка

Table 4. Comparison of sequenced nucleotide sequences of 16S RNA fragments with known data in the international bank database

Идентифицируемый штамм	Штамм в базе данных	Процент идентичности
A2	<i>Shigella boydii</i> strain P288	92,93
	<i>Shigella flexneri</i> strain ATCC 29903	92,93
	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	92,93
BS1	<i>Bacillus proteolyticus</i> strain MCCC 1A00365	96,19
	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	96,19
	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169	96,19
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792	96,19

Визуализация реакции агглютинации. Результаты микроскопирования реакции агглютинации клеток изолята А2 наглядно подтверждают активность лектинов BS1 (рис. 1).

В присутствии внеклеточных лектинов BS1 наблюдается визуализируемое в процессе микроскопирования «склеивание» клеток бактерий изолята А2.

Способность к синтезу матрикса биопленки. На рис. 2 представлены колонии исследуемых культур на питательной среде с добавлением красителя конго красный.

В процессе культивирования колонии культуры А2 окрасились в темно-красный цвет, колонии изолята BS1 стали светло-красными. По цвету данных колоний можно утверждать, что изоляты способны синтезировать экзополисахаридный матрикс (основной компонент бактериальных биопленок)⁶. Полученные результаты представляют интерес для дальнейшего исследования биопленок культур в составе полученных изолятов.

Седиментация активного ила. Результаты седиментации активного ила представлены на рис. 3.

⁶Марданова А.М., Кабанов Д.А., Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р. Биопленки: основные методы исследования: учеб.-метод. пособие. Казань: Изд-во К(П)ФУ. 2016. 42 с.

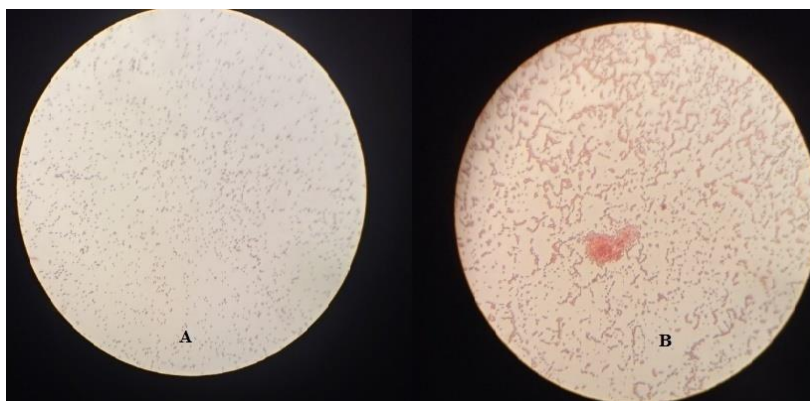


Рис. 1. Агглютинация бактериальных клеток A2 под действием внеклеточных лектинов BS1 (увеличение $\times 400$);
 А – микрофотография клеток изолята A2 в собственной культуральной жидкости;
 В – микрофотография клеток A2 под действием внеклеточных лектинов BS1

Fig. 1. Agglutination of A2 bacterial cells under the action of BS1 extracellular lectins (magnification $\times 400$);
 А – photomicrograph of A2 cells in their own culture fluid;
 В – photomicrograph of A2 cells exposed to BS1 extracellular lectins

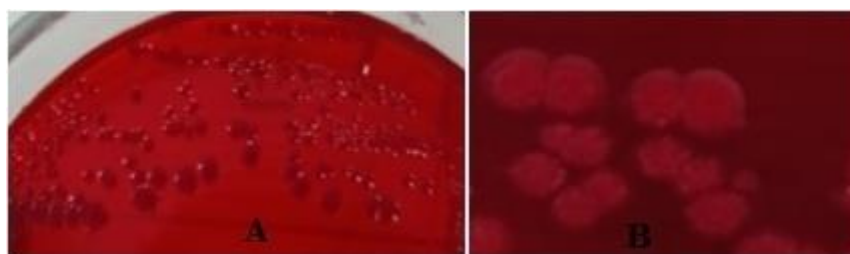


Рис. 2. Фотографии колоний: А – изолят A2; В – изолят BS1

Fig. 2. Colony photos: А – isolate A2; В – isolate BS1

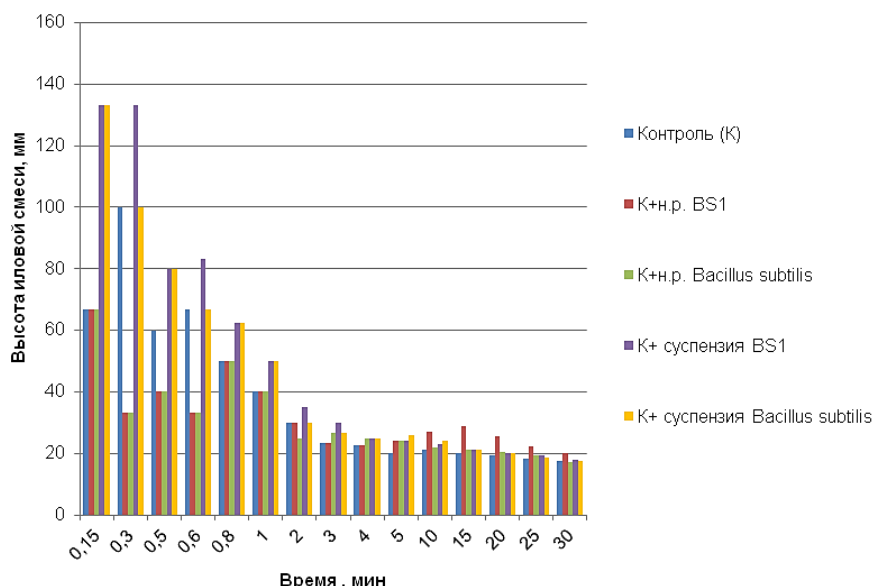


Рис. 3. Кривые кинетики снижения границы раздела ил–вода

Fig. 3. Kinetic curves of a decrease in the sludge–water interface

Наибольшая эффективность седиментации активного ила при добавлении нативного раствора выделенных изолятов была зарегистрирована для изолята BS1 – от 17 до 43% и выше по сравнению с контролем в различных интервалах 30-минутного времени седиментации. При этом не было отмечено повышения эффективности процесса седимен-

тации в первые 5 мин осаждения активного ила с нативными растворами изолятов. Добавление в активный ил нативного раствора культуры *Bacillus subtilis* показало ускорение седиментации активного ила не более чем на 20% в начальный момент времени осаждения.

В случае внесения в активный ил клеточной

суспензии изолята BS1 было показано значительное улучшение седиментации в первый момент времени: на 100, 33, 33, 25, 25, 25, 16 и 28%, в период с 10 с до 3 мин соответственно по сравнению с контролем. Добавление в активный ил суспензии *Bacillus subtilis* показало увеличение скорости осаждения активного ила на 100% на 10 с, 33% на 30 с и по 25% на 50 с и 1 мин соответственно.

Полученные выше данные позволяют предположить, что изменение характера процесса седиментации при внесении нативного раствора (источника лектинов) либо клеточной суспензии (продуцентов лектинов) связано с наличием/отсутствием микробных клеток в культуральной жидкости, внесимой в активный ил. При этом следует отметить, что при внесении суспензии клеток в начальный период осаждения происходит быстрая агглютинация между поверхностными лектинами клеток продуцента и комплементарными компонентами активного ила, что приводит к повышению эффективности осаждения активного ила. Внесение нативного раствора как источника внеклеточных лектинов обеспечивает ускорение процесса седиментации активного ила лишь по истечении первых 5 мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Получены изоляты A1, A2, A3, A4 и BS1 из микробного сообщества активного ила очистных сооружений г. Зеленодольск (Республика Татарстан).

2. Оценена активность внеклеточных лектинов в нативном растворе изолята BS1 к клеткам изоля-

тов A1, A2, A3, A4. Наибольшую лектиновую активность нативный раствор BS1 проявил к клеткам изолята A2 (AG=2 ед.) и A4 (AG=2 ед.), наименьшую активность – к клеткам изолята A1 (AG=1 ед.), не проявлял активности – к клеткам изолята A3 (AG=0 ед.).

3. По культурально-морфологическим признакам и физиолого-биохимическим свойствам изолят A2 отнесен к роду *Acinetobacter*, изолят BS1 – к роду *Bacillus*. С помощью молекулярно-генетического анализа показано, что изолят BS1 относится к бактериям р. *Bacillus*, а изолят A2 – к бактериям р. *Shigella* или р. *Escherichia*.

4. Визуализацией реакции бактериальной агглютинации при микроскопировании препаратов подтверждена активность внеклеточных лектинов BS1 к бактериальным клеткам A2.

5. Оценена способность культур изолятов A2 и BS1 синтезировать экзополисахаридный матрикс высевом на плотную питательную среду с добавлением красителя конго красный. По цвету колоний сделан вывод о том, что культуры A2 и BS1 способны синтезировать матрикс внеклеточных полимеров и участвовать в образовании биопленки.

6. Показано, что скорость седиментации активного ила увеличивалась при внесении суспензии клеток изолята BS1 в начальный период процесса осаждения, а при внесении нативного раствора изолята BS1 – по истечении 5 мин контакта.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Grishin A. V., Krivozubov M. S., Karyagina A. S., Gintsburg A. L. *Pseudomonas aeruginosa* lectins as targets for novel antibacterials // *Actanaturae*. 2015. Vol. 7, no. 2. P. 29–41. <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-2-29-41>.

2. Луцик А. Д., Детюк Е. С., Луцик М. Д. Лектины в гистохимии. Львов: Вища шк., 1989. 142 с.

3. Кобелев А. В., Сироткин А. С. Лектины: обзор свойств и перспектив использования в биотехнологии // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова*. 2018. Т. 14. N 2. С. 60–67.

4. Muhammadiev R. S., Bagaeva T. V. Isolation and structural characterization of lectin micromycetes *Rhizoctonia solani* // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2015. Vol. 6, no. 6. P. 1756–1763.

5. Алешин В.Н., Лобанов В.Г., Минакова А.Д. Лектины: свойства, сферы применения и перспективы исследования // *Известия вузов. Пищевая технология*. 2005. N 1 (284). С. 5–7.

6. Ancy J. A., Vasanthi M., Thamarai selvi C., Ravindran B., Woo J. C., Soon W. C. Treatment of coffee cherry pulping wastewater by using lectin protein isolated from *Ricinus communis* L. seed. // *Journal of Water Process Engineering*. 2020. Vol. 39, no. 3. Article number 101742. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101742>.

7. Кобелев А. В., Клементьев С. В., Вдовина Т. В.,

Хабибуллина А. Р., Сироткин А. С. Оценка активности внеклеточных лектинов бактерий активного ила // *Пищевые технологии и биотехнологии: материалы XVI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвященной 150-летию Периодической таблицы химических элементов* (Казань, 16–19 апреля 2019 г.), в 3 ч. Казань: Изд-во КНИТУ, 2019. Ч. 2. С. 102–105.

8. Кобелев А.В., Клементьев С.В., Вдовина Т.В., Сироткин А.С. Оценка активности внеклеточных лектинов бактерий в формировании агрегированных микробных форм // *Бутлеровские сообщения*. 2021. Т. 65, N 1. С.105–113. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/21-65-1-105>.

9. Пат. № 2660567, Российская Федерация. Способ выделения и идентификации бактерий комплекса *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* / Е. П. Сиволодский; патентообладатель Е.П. Сиволодский; заявл. 29.08.2017; опубл. 06.07.2018. Бюл. № 19.

10. Феоктистова Н. А., Мустафин А. Х., Калдыркаев А. И., Васильев Д. А. Выделение бактерий вида *Bacillus subtilis* из объектов санитарного надзора // *Молодежь и наука XXI века: материалы III Международной науч.-практ. конф. молодых ученых* (Ульяновск, 23–26 ноября 2010 г.). Ульяновск: Изд-во УГСХА, 2010. Т. 3: Актуальные вопросы микробиологии, вирусологии, эпи-

зоотологии и биотехнологии. С. 72–75.

11. Феоктистова Н. А., Калдыркаев А. И., Муштафин А. Х. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. N 4 (32). С. 288–290.

12. Martins dos Santos H. R., Argolo C. S., Argôlo-Filho R. C., Loguerico L. L. A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information // BMC Microbiology. 2019. Vol. 19, no. 1. Article number 74. 14 p. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1446-2>.

13. Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E. M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denatur-

ing gradients // Applied and Environmental Microbiology. 1997. Vol. 63, no. 8. P. 3233–3241. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.8.3233-3241.1997>.

14. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. Львов: Вища шк.1981. 156 с.

15. Freeman D. J., Falkner F. R., Keane C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci // Journal of Clinical Pathology. 1989. Vol. 42, no. 8. P. 872–874. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>.

16. Ярец Ю. И., Шевченко Н. И. Новый метод анализа бактериальной биопленки // Наука и инновации. 2016. N 10 (164). С. 64–68.

17. Кулаков А. А., Макиша Н. А., Шафигуллина А. Ф., Хардер Р. Исследование седиментационных свойств иловой смеси городских канализационных очистных сооружений // Вестник МГСУ. 2018. Т. 13. N 5 (116). С. 643–650. <https://doi.org/10.22227/1997-0935.2018.5.643-650>.

REFERENCE

1. Grishin A. V., Krivozubov M. S., Karyagina A. S., Gintsburg A. L. *Pseudomonas aeruginosa* lectins as targets for novel antibacterials. *Acta naturae*. 2015;7(2):29–41. <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-2-29-41>.

2. Lutsik A. D., Detyuk E. S., Lutsik M. D. *Lectins in histochemistry*. Lvov: Vischa shkola; 1989.142 p. (In Russian).

3. Kobelev A. V., Sirotkin A. S. Lectins: A review of properties and prospects for use in biotechnology. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoi biologii imeni Yu. A. Ovchinnikova = Yu. A. Ovchinnikov bulletin of biotechnology and physical and chemical biology*. 2018; 14(2):60–67. (In Russian).

4. Muhammadiev R. S., Bagaeva T. V. Isolation and structural characterization of lectin micromycetes *Rhizoctonia solani*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2015;6(6):1756–1763.

5. Aleshin V. N., Lobanov V. G., Minakova A. D. Lectins: properties, applications and research prospects. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Pishhevaya tehnologiya = News of Institutes of Higher Education. Food Technology*. 2005;1:5–7. (In Russian).

6. Ancy J. A., Vasanthy M., Thamarai selvi C., Ravindran B., Woo J. C., Soon W. C. Treatment of coffee cherry pulping wastewater by using lectin protein isolated from *Ricinus communis* L. seed. *Journal of Water Process Engineering*. 2020;39(3). Article number 101742. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101742>.

7. Kobelev A. V., Klementyev S. V., Vdovina T. V., Khabibullina A. R., Sirotkin A. S. Assessment of extracellular lectins activity of activated sludge bacteria. In: *Pishchevye tekhnologii i biotekhnologii: materialy XVI Vserossiiskoi konferentsii molodykh uchenykh, aspirantov i studentov s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoi 150-letiyu Periodicheskoi tablitsy khimicheskikh elementov = Food*

technologies and diotechnologies: Proceedings of XVI All-Russian Conference of Young Scientists, Postgraduates and Students with International Participation, dedicated to the 150th anniversary of the Periodic Table of Chemical Elements, 16–19 April 2019, Kazan. Kazan: Izdatel'stvo KNITU; 2019, part 2, p. 102–105. (In Russian).

8. Kobelev A. V., Klement'ev S. V., Vdovina T. V., Sirotkin A. S. Evaluation of the activity of bacterial extracellular lectins in the formation of aggregated microbial forms. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2021;65(1):105–113. (In Russian).

9. Sivolodsky E. P. Method for isolation and identification of bacteria of *Acinetobacter calcoaceticus – Acinetobacter baumannii* complex. Patent RF, no. 2660567; 2017. (In Russian).

10. Feoktistova N. A., Mustafin A. H., Kaldyркаев А. I., Vasiliev D. A. Allocation of bacteria of type bacillus subtilis from objects of sanitary inspection. In: *Molodezh' i nauka XXI veka: materialy III Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii molodykh uchenykh = Youth and Science of the XXI Century: Proceedings of the III International Scientific and Practical Conference of Young Scientists*. 23–26 November 2010, Ul'yanovsk. Ul'yanovsk, 2010. Vol. 3: *Aktual'nye voprosy mikrobiologii, virusologii, epizootologii i biotekhnologii = Actual problems of microbiology, virology, epizootology and biotechnology*, p. 72–75. (In Russian).

11. Feoktistova N. A., Kaldyркаев А. I., Mustafin A. Kh. Working out of an outline of the patterns study aimed at isolating and rapid identification of bacillus subtilis, and bacillus cereus bacteria species. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Bulletin of the Orenburg State Agrarian University*. 2011;4:288–290. (In Russian).

12. Martins dos Santos H. R., Argolo C. S., Argôlo-Filho R. C., Loguerico L. L. A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses

ses of diversity information. *BMC Microbiology*. 2019;19(1). Article number 74. 14 p. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1446-2>.

13. Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E. M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;63(8):3233–3241. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.8.3233-3241.1997>.

14. Lutsik A. D., Panasyuk E. N., Lutsik M. D. *Lectins*. Lvov: Vischa shkola; 1981.156 p. (In Russian).

15. Freeman D. J., Falkiner F. R., Keane C. T. New method for detecting slime production by co-

agulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. 1989;42(8):872–874. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>.

16. Yarets Yu. I., Shevchenko N. I. A new method for the bacterial biofilms analysis in medicine. *Nauka i innovatsii = Science and Innovations*. 2016;10:64–68. (In Russian).

17. Kulakov A. A., Makisha N. A., Shafigullina A. F., Harder R. Investigation of sedimentation properties of sludge liquor at wastewater treatment plants. *Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo stroitel'nogo universiteta = Vestnik MGSU*. 2018;13(5):643–650. (In Russian). <https://doi.org/10.22227/1997-0935.2018.5.643-650>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

А. В. Кобелев,

ведущий инженер,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68,
Российская Федерация,
alexei-ksu@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9070-739X>

С.В. Клементьев,

магистрант, техник 1 категории,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68,
Российская Федерация,
slava_klementev3715@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5459-974X>

А. С. Сироткин,

д.т.н., профессор,
заведующий кафедрой промышленной
биотехнологии,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68,
Российская Федерация,
asirotkin66@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4480-9907>

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.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 16.10.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Alexei V. Kobelev,

Lead Engineer,
Kazan National Research Technological
University,
68, K. Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
alexei-ksu@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9070-739X>

Svyatoslav V. Klement'ev,

Master's Student,
Technician of the 1st category,
Kazan National Research Technological
University,
68, K. Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
slava_klementev3715@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5459-974X>

Alexander S. Sirotkin,

Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Head of the Department of Industrial
Biotechnology,
Kazan National Research Technological
University,
68, K. Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
asirotkin66@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4480-9907>

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.

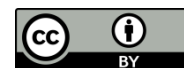
*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 16.10.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.

Научная статья
УДК 543.424:664.1

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-627-641>



Оптические свойства мёдов: методы ИК-Фурье спектроскопии и рефрактометрии

Алла Павловна Нечипоренко*, Ольга Сергеевна Везо**,
Ульяна Юрьевна Нечипоренко***, Людмила Валерьевна Плотникова**,
Вера Евгеньевна Ситникова*, Полина Ильинична Украинцева*,
Петр Петрович Плотников**

*Университет ИТМО, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

***Независимая лаборатория «ИНВИТРО СПб.», г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Нечипоренко Алла Павловна, allanech2512@yandex.ru

Аннотация. Методами инфракрасной спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения, рефрактометрии и биохимического анализа проведено исследование 115 образцов мёда разного ботанического вида, географического происхождения и года сбора (2019–2021 гг.). Исследовались образцы исходных мёдов в жидком и закристаллизованном состоянии. В качестве вспомогательных веществ были использованы кристаллические препараты D-глюкопиранозы (глюкозы), D-фруктопиранозы (фруктозы), их 40%-ые растворы и инвертированный сахар. Методом биохимического анализа определено содержание глюкозы в выборке мёдов. На основании полученных данных установлена связь между результатами биохимического анализа и рефрактометрии (показатель преломления, содержание инвертированных сахаров, влажность). Получены уравнения, позволяющие оценить содержание глюкозы и фруктозы в мёдах по рефрактометрическому показателю. Исследование мёдов методом ИК-спектроскопии показало, что весь набор исследованных образцов мёдов, независимо от ботанического вида и географии их происхождения, может быть представлен тремя группами с преобладанием: I – глюкозы, II – фруктозы и III – переходная, с близким содержанием двух моносахаридов. Это позволило идентифицировать полосы, обусловленные α - и β -пиранозными формами глюкозы и фруктозы, а также оценить характер их изменения в зависимости от соотношения обоих моносахаридов в мёдах в результате их кристаллизации. Отмечено, что соотношение моносахаридов предопределяет не только устойчивость жидкокристаллической структуры мёдов и скорость кристаллизации, но и их оптические, биохимические, пищевые свойства, которые важны для предпочтительного использования мёдов в медицинской и фармакопейной практике, диетологии, косметологии.

Ключевые слова: монофлерные и полифлерные мёды, моносахариды, α - и β -пиранозные формы, оптические свойства, Фурье ИК-спектроскопия, рефрактометрия

Для цитирования: Нечипоренко А. П., Везо О. С., Нечипоренко У. Ю., Плотникова Л. В., Ситникова В. Е., Украинцева П. И., Плотников П. П. Оптические свойства мёдов: методы ИК-Фурье спектроскопии и рефрактометрии // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 627–641. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-627-641>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Optical properties of honey: FTIR spectroscopy and refractometry

Alla P. Nechiporenko*, Olga S. Vezo**, Ulyana Yu. Nechiporenko***,
Liudmila V. Plotnikova**, Vera E. Sitnikova*, Polina I. Ukraintseva*,
Petr P. Plotnikov**

*National research University of information technology, mechanics and optic,
St. Petersburg, Russian Federation

© Нечипоренко А. П., Везо О. С., Нечипоренко У. Ю., Плотникова Л. В., Ситникова В. Е., Украинцева П. И.,
Плотников П. П., 2021

******St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation.

*******Independent laboratory "INVITRO SPb.", St. Petersburg, Russian Federation

Corresponding author: Alla P. Nechiporenko, allanech2512@yandex.ru

Abstract. 115 samples of honey of various botanical types, geographical origin and harvest year (2019–2021) were analysed using attenuated total reflection infrared spectroscopy of impaired total reflection, refractometry and biochemical analysis. Initial honey samples in liquid and crystallised states were investigated. Crystalline D-glucopyranose (glucose), D-fructopyranose (fructose), their 40% solutions and invert sugar were used as auxiliary substances. Biochemical analysis was used to determine the glucose content in honey samples. Based on the obtained data, a relationship between the results of biochemical analysis and refractometry (refractive index, the content of invert sugars, humidity) was established. We deduced equations that allow the content of glucose and fructose in honey to be evaluated by the refractive index. Studying honey by IR spectroscopy showed that all investigated samples, regardless of the botanical and geographical origins, can be classified into three groups dominated by: I – glucose, II – fructose and III – mixed, with a close content of two monosaccharides. This allowed the bands characteristic of α - and β -pyranose forms of glucose and fructose to be identified, as well as the nature of their changes depending on the ratio of both monosaccharides in honey as a result of their crystallisation to be assessed. It is noted that the ratio of monosaccharides determines not only the stability of the liquid crystal structure and crystallisation rate in honey but also their optical, biochemical and nutritional properties, which are important for the preferred use of honey in medical and pharmacopoeial practice, dietetics and cosmetology.

Keywords: monofloral and polyfloral honey, monosaccharides, α - and β -pyranose forms, optical properties, FTIR spectroscopy, refractometry

For citation: Nechiporenko A. P., Vezo O. S., Nichiporenko U. Yu., Plotnikova L. V., Ukraintseva P. A., Ukraintseva P. I., Plotnikov P. P. Optical properties of honey: FTIR spectroscopy and refractometry. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):627-641. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-627-641>.

ВВЕДЕНИЕ

Пчелиный мед – один из сложнейших естественных продуктов растительно-животного происхождения, результат превращения нектара в организме рабочей пчелы при различных физиологических и физико-химических процессах¹ [1]. Как уникальный дар природы мед с древнейших времен используется народами всех культур не только как сладкий и питательный пищевой продукт, но и как лечебное средство с широким спектром действия в официальной и народной медицине, фармакопее, диетологии, косметологии [2–7]. Известны сотни препаратов и лекарственных форм, содержащих мед.

Специфические особенности биохимического действия меда, позволяющие ему проявлять свои целебные свойства, обусловлены многообразием активных компонентов, гармонично сочетающихся между собой, что также дает возможность человеческому организму усваивать мед практически на 100% [8, 9]. В составе меда обнаружено более четырехсот различных компонентов: минеральные вещества; сахара; ферменты; amino-, жирные, насыщенные и полиненасыщенные кислоты; флавоноиды; витамины. Однако процентный и химический состав меда непостоянен и зависит от множества факторов, влияющих на его пищевую, лечебно-профилактическую и биологическую ценность. К ним относятся: ботанический вид медоносных

растений, с которых собран нектар, географический регион и состав почвы, на которой они произрастают; погодные и климатические условия (температура, влажность и др.), время сбора (весенний, летний или осенний); содержание, уход, физиологическое состояние и порода пчел [10, 11]. Кроме того, мед – это изменчивый живой продукт. За время, проходящее от сбора нектара до извлечения меда из сот и при дальнейшем хранении, в нем происходит ряд химических процессов, изменяющих его свойства. Однако основные группы веществ в составе меда характерны и постоянны.

В общем случае мед подразделяют на цветочный и падевый. Цветочный мед классифицируют по ботаническому виду растительных медоносов [2]:

– монофлерный мед – мед, основная часть которого (от 40%) получена с одного вида растений. Обычно ему придают название этого растения – липовый, акациевый, каштановый, кипрейный, гречишный и т.д.;

– полифлерный мед – это мед, собранный с растений разного вида. Название полифлерного меда как правило связано с видом медоносных угодий: луговой, степной, полевой, лесной, горный, таежный, цветочный, разнотравье. Часто монофлерные и полифлерные меды классифицируют по району их сбора (дальневосточный липовый, башкирский липовый, сибирский ки-

¹Козин Р. Б., Лебедев В. И., Иренкова Н. В. Биология медоносной пчелы: учеб. пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности «Зоотехния» и «Ветеринария». СПб.: Лань, 2007. 320 с.

прейный, алтайское горное разнотравье и т.д.).

Частным случаем полифлерных медов являются натуральные смешанные меды, собранные пчелами с одновременно цветущих растений (шалфей и липа, каштан и акация) и искусственно смешанные. На крупных заготовительных пунктах, подготавливающих к продаже большие партии меда, производят так называемое купажи́рование меда, то есть смешивание его отдельных видов и сортов. По консистенции мед бывает жидкий, густоватый или закристаллизовавшийся.

Независимо от ботанического вида меда, района и времени сбора веществами, составляющими его основу, являются углеводы, на 80–90% представленные двумя моносахаридами – глюкозой и фруктозой. Их свойства и соотношение определяют основные качества меда: сладость, питательную ценность, способность к кристаллизации, гигроскопичность и т.д. Процентное соотношение глюкозы и фруктозы зависит не только от вида растения, но и от географии его произрастания, погодных условий. Хотя и в небольших количествах в меде содержатся сахароза, мальтоза, трегалоза, декстрины и др. Состав меда по моно- и дисахаридам значительно колеблется и на различных стадиях его созревания и стабилизации в процессе хранения. Поэтому данные по составу сахаров меда обычно приводят в определенном интервале.

Натуральный мед нередко является объектом фальсификации, способы которой довольно многочисленны и разнообразны [12, 13]. В работах ученых разных стран выявлению фальсификата уделено много внимания. Для определения качества меда применяют органолептические, химические, физические и физико-химические методы² (хроматография, рефрактометрия, УФ- и ИК-спектроскопия, ЯМР, калориметрия, поляриметрия, микроскопия, реология, и др.), позволяющие измерять коэффициенты преломления и рефракции, кислотность, вязкость, влажность, микроэлементный, пыльцевый, вещественный и углеводный составы, содержание инвертированных сахаров, глюкозы и фруктозы, антибиотиков, пестицидов, диастазное число, пиранозно-фуранозную и вторичную структуры углеводных ингредиентов и другие параметры [14–17].

В последние годы появилось значительное количество публикаций по исследованию натуральных и фальсифицированных медов³ разного ботанического вида и географического (регионального) происхождения с использованием наряду с методами ЯМР метода ИК-спектроскопии нарушенного

полного внутреннего отражения (ИКС НПВО) как высокочувствительного и информативного метода при изучении углеводов [15–20].

Однако при этом в опубликованных работах имеются значительные разночтения и неоднозначность в интерпретации природы спектральных полос.

Цель данной работы состояла в исследовании методами ИКС НПВО, рефрактометрии и биохимического анализа серии отечественных полифлерных и монофлерных медов разного ботанического вида, географического происхождения и времени сбора на содержание глюкозы и фруктозы и спектральную проявленность их α - и β -пиранозных форм в зависимости от соотношения двух основных моносахаридов в составе образцов жидкого и закристаллизованного меда.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования являлись 115 образцов монофлерных и полифлерных медов разного ботанического вида и географического происхождения, собранных в 2019–2021 гг., приобретенных на пасеках, в специализированных магазинах («Медовый дом», «Матушка пчела», «Пчеловодство»), в Союзе пасечников, на ярмарках «Медовый спас». Исследовались образцы жидких и закристаллизованных медов. В качестве вспомогательных веществ рассматривались кристаллические препараты D-глюкопиранозы (Химреактив, Россия), D-фруктопиранозы (Sigma Aldrich, США), их 40%-ые растворы и тримоллин (сахар инвертный кондитерский, Cremesuc, Бельгия).

Колебательные спектры (32 скана) образцов медов, инвертсахара, растворов и сухих препаратов моносахаридов получали на Фурье-спектрометре Tensor 37 (Bruker, Германия) с алмазным НПВО элементом в диапазоне волновых чисел 4000–600 см⁻¹. Перед исследованием растворы моносахаридов сушили при комнатной температуре в течение 10–12 ч на предметных стеклах, избегая кристаллизации. Рефрактометрические показатели образцов медов (показатель преломления – n_D ; содержание инвертированных сахаров, %; влажность, %) снимали на цифровом рефрактометре Abbemat WR/MW (Anton Paar, Австрия) при длине волны 589,3 нм («Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники», Научный парк СПбГУ). Содержание глюкозы (%) в выборке образцов медов определяли в медицинском центре «ИНВИТРО СПб» на биохимическом анализаторе BA-400 (Испания) глюкозооксидазным методом, представленным в учебном пособии «Клиническая лабораторная диагностика»⁴, с реактивами Biosystems. Содержание фруктозы (%)

²ГОСТ Р 52451-2005. Меды монофлерные. Технические условия; ГОСТ Р 54644-2011. Мед натуральный. Технические условия; ГОСТ 31774-2012. Мед. Рефрактометрический метод определения воды.

³Заикина В.И. Экспертиза меда и способы обнаружения его фальсификации: учеб пособие. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Дашков и К^о, 2012. 168 с.

⁴Кишкун А.А. Клиническая лабораторная диагностика: учеб. пособие для медицинских сестер. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 976 с.

в мёдах оценивали по разности суммы инвертированных сахаров и глюкозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 сведены данные по рефрактометрическим показателям – показатель преломления (n_D , $\lambda=589,3$ нм), массовая доля инвертированных сахаров, влажность выборки образцов моно- и полифлерных мёдов разного ботанического вида, географического происхождения и времени сбора.

Как следует из представленных в табл. 1 данных, образцы мёдов даже одного ботанического вида, региона и года сбора заметно различаются по всем курируемым параметрам. Наименьший разброс по рефрактометрическим показателям отмечен для каштановых мёдов и белой акации (Краснодарский край, 2019–2021 гг.). Графическая

обработка рефрактометрических данных показала линейную связь между показателем преломления и массовой долей инвертированных сахаров, а также влажностью исследованных объектов (рис. 1, а).

Увеличению показателя преломления мёда отвечало повышение в нем содержания инвертированных сахаров и снижение влажности. Это послужило основанием для проведения анализа выборки мёдов независимым биохимическим методом на содержание в них массовой доли глюкозы ($m_{г\text{л}}$, %). Содержание фруктозы ($m_{ф\text{р}}$, %) находили по разнице массовых долей инвертированных сахаров и глюкозы согласно следующему выражению:

$$m_{ф\text{р}} = m_{\text{инверт.сах}} - m_{г\text{л}}$$

Таблица 1. Рефрактометрические и расчетные показатели мёдов

Table 1. Refractometric and calculated indicators of honey

Номер образца	Мёд	n_D , 589,3 нм	Инверт. сахара, (%)	Глюкоза, % (расч.)	Фруктоза, % (расч.)	Влажность, %	Географическое происхождение, год сбора
Монофлерные мёды							
1	Акация бел	1,49686	84,61	31,09	53,52	15,87	Краснодар, 2019
2	Акация бел	1,49702	84,68	30,90	53,77	15,81	Воронеж, 2020
3	Акация бел	1,49417	83,52	34,23	49,26	16,93	Краснодар, 2021
4	Акация бел	1,49179	82,55	37,04	45,49	17,87	Краснодар, 2021
5	Вересковый	1,48752	80,80	42,05	38,73	19,57	Ленингр. обл. 2020
6	Гречишный	1,49658	84,50	31,42	53,07	15,99	Оренбург, 2020
7	Гречишный	1,48776	80,90	41,77	39,11	19,47	Орловская обл., 2020
8	Гречишный	1,49724	84,77	30,64	54,12	15,73	Алтай, 2021
9	Гречишный	1,49127	82,34	37,65	44,67	18,07	Орловская обл. 2021
10	Гречишный	1,49055	82,04	38,50	43,53	18,36	Оренбург, 2020
11	Донниковый	1,48704	80,60	42,62	37,97	19,76	Псков, 2020
12	Донниковый	1,49526	83,96	33,00	50,98	16,50	Самара, 2020
13	Каштановый	1,49565	84,12	32,51	51,60	16,35	Краснодар, 2021
14	Каштановый	1,49323	83,13	35,35	47,77	17,30	Краснодар, 2020
15	Каштановый	1,49390	83,41	34,57	48,83	17,04	Краснодар, 2020
16	Кипрейный	1,49686	84,61	31,09	53,52	15,88	Ульяновск, 2021
17	Кориандровый	1,49585	84,20	32,29	51,90	16,27	Краснодар, 2021
18	Лавандовый	1,49158	82,47	37,29	45,16	17,95	Крым, 2020
19	Липовый	1,49443	83,63	33,94	49,67	16,83	Краснодар, 2021
20	Липовый	1,48904	81,43	40,27	41,14	18,96	Дальний Восток, 2020
21	Липовый	1,49351	83,25	35,02	48,21	17,19	Ленингр. обл. 2020
22	Подсолнечник	1,49102	82,24	37,95	44,27	18,17	Краснодар, 2021
23	Черноклен	1,49232	82,76	36,42	46,33	17,66	Воронеж, 2020
24	Шалфейный	1,49098	82,21	38,00	44,21	18,19	Воронеж, 2020.
25	Шалфейный	1,49135	82,37	37,56	44,79	18,04	Белгород, 2021
26	Эвкалиптовый	1,48795	80,98	41,55	39,41	19,39	Абхазия, 2020
27	Эспарцетовый	1,49253	82,85	36,17	46,66	17,57	Алтай, 2021
Полифлерные мёды							
28	Горный	1,49373	83,34	34,77	48,56	17,10	Карачаево-Черкесс.
29	Диких пчел	1,49356	83,27	34,97	48,28	17,17	Башкирия, 2020
30	Лесной	1,49298	83,04	35,64	47,37	17,39	Минер. воды, 2020
31	Лесной	1,49665	84,53	31,34	53,18	15,96	Минер. воды, 2021
32	Луговой	1,48800	81,00	41,47	39,49	19,37	Белгород, 2021,
33	Майский	1,49000	81,82	39,15	42,66	18,58	Краснодар, 2021
34	Разнотравье	1,49035	81,96	38,73	43,21	18,44	Псков, 2020
35	Разнотравье	1,49740	84,83	30,46	54,37	15,66	Оренбург, 2021
36	Разнотравье	1,49580	84,18	32,34	51,84	16,29	Ленингр. обл. 2021
37	Разнотравье	1,49006	81,84	39,08	42,75	18,56	Амурск. обл, 2020
38	Разнотравье	1,48804	81,05	41,45	39,55	19,36	Горный Алтай, 2020
39	Степной	1,48545	79,94	44,49	35,45	20,40	Саратов, 2019
40	Цветочный	1,49052	82,03	38,54	43,48	18,37	Мордовия, 2020
41	Цветочный	1,48954	81,62	39,69	41,93	18,77	Новгород, 2021

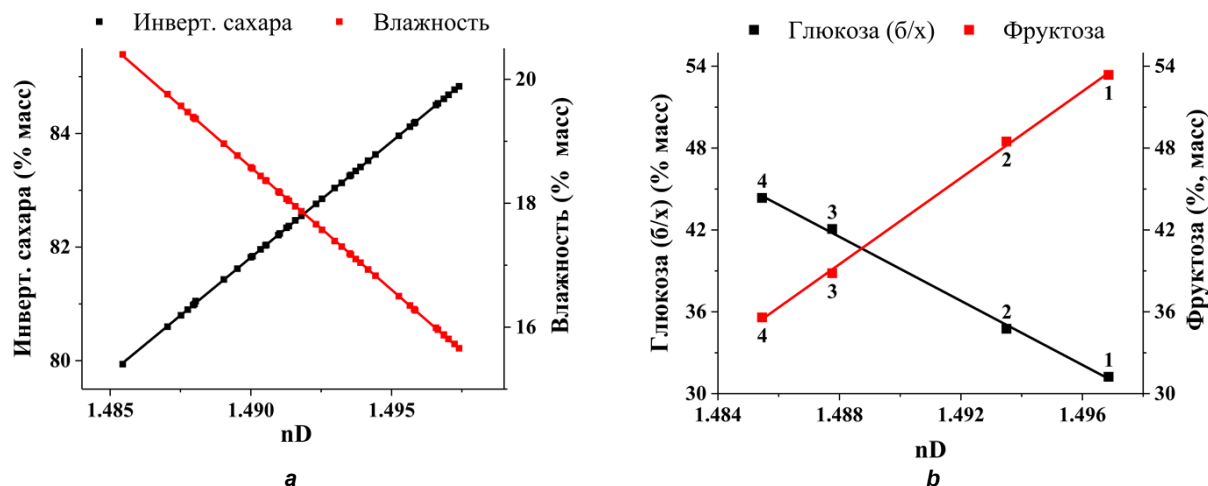


Рис. 1. Зависимость: а – содержания инвертированных сахаров и влажности; б – содержания фруктозы и глюкозы от показателя преломления меда
1 – степного; 2 – гречишного; 3 – каштанового; 4 – акации белой

Fig. 1. Dependencies: а – inverted sugars content and humidity; б – fructose and glucose content and refractive index of honey:
1 – steppe; 2 – buckwheat; 3 – chestnut; 4 – white acacia

Измеренные биохимические значения содержания глюкозы и рассчитанные значения содержания фруктозы для выборки монофлерных медов, а также соответствующие рефрактометрические показатели представлены в табл. 2.

При графической обработке полученные данные также показали линейные, но противоположно направленные зависимости массовой доли для обоих моносахаридов от показателя преломления меда (рис. 1, б). Причем уменьшению содержания глюкозы в меде, кристаллизующейся, в отличие от фруктозы, с двумя молекулами воды, отвечает снижение его влажности. Обратный эффект дают меды с более высоким содержанием фруктозы. С увеличением именно содержания фруктозы возрастает показатель преломления меда. Это позволило получить уравнения для оценки массовой доли (m, %) глюкозы и фруктозы в медах по их показателю преломления (n_D) и рассчитать содержание моносахаридов во всей совокупности исследуемых медов (рис. 2, а, см. табл. 1):

$$m_{\text{гл}}, (\text{б/х, \% масс.}) = 1788,659 - 1174,17 \cdot n_D;$$

$$m_{\text{фр}} (\% \text{ масс.}) = -2316,11 + 1583,065 \cdot n_D.$$

Также удалось оценить их соотношение ($m_{\text{фр}}/m_{\text{гл}}$) в медах (рис. 2, б) и разделить весь ассортимент образцов на две группы: I – с повышенным содержанием глюкозы, и II – с повышенным содержанием фруктозы, и рассчитать содержание моносахаридов во всей совокупности исследуемых медов (см. табл. 1, рис. 2, а): отношению $m_{\text{фр}}/m_{\text{гл}}=1$ соответствовало $n_D = (1,4888 \pm 0,0001)$, при $m_{\text{гл}} = m_{\text{фр}} = (41,0 \pm 0,5)\%$.

Исследованию медов методом ИКС НПВО предшествовал анализ глюкозы и фруктозы в кристаллическом состоянии и в виде водных 40%-х растворов, полученных при комнатной температуре. Концентрация 40% выбрана как усредненная и близкая к концентрации глюкозы и фруктозы в составе натуральных медов. Известно⁵ [21], что данные моносахариды кристаллизуются преимущественно в одной из циклических пиранозных форм, имеющих конформацию «кресла»: для глюкозы характерна α -глюкопиранозная, а для фруктозы – β -фруктопиранозная формы как энергетически наиболее устойчивые.

Таблица 2. Результаты биохимического и рефрактометрического анализа выборки полифлерных и монофлерных медов

Table 2. Results of biochemical and refractometric analysis of polyfloral and monofloral honeys

Мед	Глюкоза (б/х), % масс.	n_D	Инвертируемые сахара, % масс.	Фруктоза, % масс.	Влажность, % масс.
Степной	44,35	1,48545	79,94	35,59	20,40
Гречишный	42,07	1,48776	80,90	38,83	19,47
Каштановый	34,76	1,49350	83,24	48,48	17,20
Акации бел.	31,24	1,49686	84,61	53,37	15,87

⁵Северин Е. С., Алейникова Т. Л., Осипов Е. В., Силаева С. А. Биологическая химия: учебник для студентов медицинских вузов. 3-е изд., испр. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2017. 496 с.

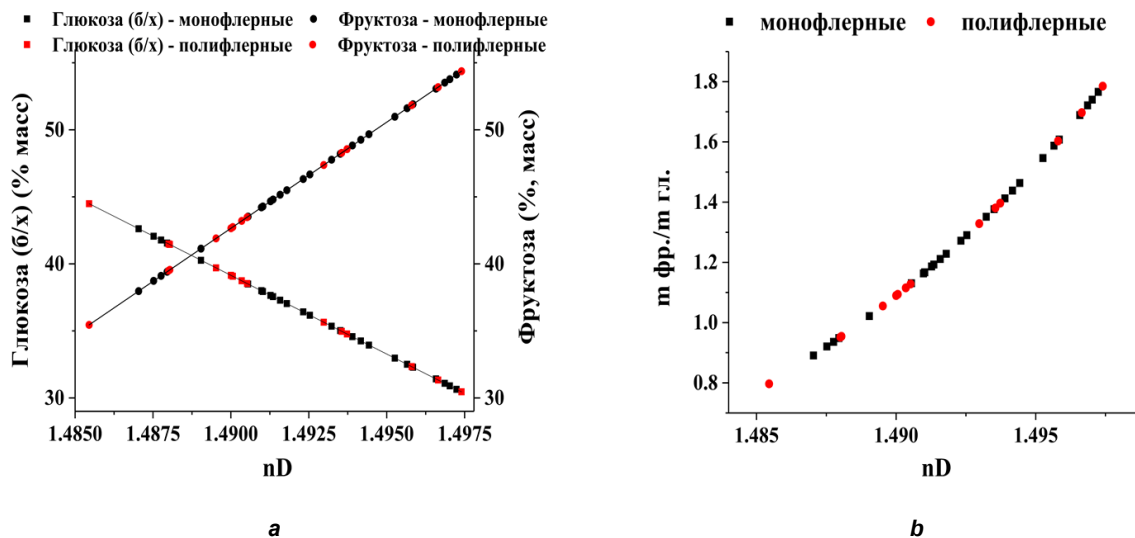


Рис. 2. Зависимость: а – содержания глюкозы и фруктозы;
б – соотношения их массовых долей m_{fr}/m_{gl} в моно- и полифлерных мёдах от показателя преломления

Fig. 2. Dependences: a – glucose and fructose content;
b – ratio of their mass fractions m_{fr}/m_{gl} in mono- and polyfloral honey on the refractive index

Инфракрасный спектр основных структурных группировок углеводов расположен в области $1500\text{--}750\text{ см}^{-1}$, где проявляются колебания C–O, C–O–C, C–C, C–OH, CH_2 -связей. На рис. 3, а приведены фрагменты наиболее информативного диапазона ($1200\text{--}750\text{ см}^{-1}$) ИК-спектров кристаллических препаратов α -глюкопиранозы и β -фруктопиранозы, говорящие о существенной разнице в положении практически всех регистрируемых полос в анализируемом частотном интервале. В спектре кристаллической α -глюкопиранозы левая ветвь глобальной полосы с максимумом 1009 см^{-1} (C–O) структурирована полосами 1020 и 1046 см^{-1} . В более высокочастотной области наблюдается серия дифференцированных полос в положении $1072, 1093, 1107, 1124, 1154\text{ см}^{-1}$.

В области более низких частот – слабоинтенсивные полосы – $925, 915, 851, 770\text{ см}^{-1}$, из которых полоса 915 см^{-1} отвечает колебаниям C–C-связей α -формы пиранозного кольца глюкозы, а полосы 851 и 770 см^{-1} , соответственно, их асимметричным и симметричным колебаниям. При растворении кристаллическая α -глюкопираноза частично переходит в свой более устойчивый в растворах таутомерный изомер β -глюкопиранозу. Их соотношение зависит от концентрации мономера, pH и температуры раствора. Для спектра раствора глюкозы (рис. 3, б) характерно сохранение максимума 1009 см^{-1} глобальной полосы и появление мало интенсивного, но стабильного по положению дублета $915/898\text{ см}^{-1}$, в котором появление полосы 898 см^{-1} обязано формированию в растворах ее β -пиранозной конформации. С левой стороны глобального максимума число полос заметно сокращается, но отмечено, что полосы $1072, 1020, 1009,$

$915, 770\text{ см}^{-1}$, присутствующие в спектре кристаллической глюкозы, сохраняют свое положение в спектре раствора, что указывает на устойчивость конформационных состояний α -глюкопиранозы. Следует отметить, что полоса 851 см^{-1} в спектре кристаллической глюкозы смещается в положение 845 см^{-1} при ее растворении и наблюдается дифференциация полосы 988 см^{-1} на правой ветви глобального максимума, обусловленные ее β -глюкопиранозной формой.

Основу спектра кристаллической β -фруктопиранозы (рис. 3, а) составляет широкая полоса с максимумом при 1048 см^{-1} (C–O–C) и дифференцированными полосами 1093 и 1076 см^{-1} на ее левой ветви (см. рис. 3, а). В более высокочастотном диапазоне наблюдаются полосы $1176, 1146, 1136\text{ см}^{-1}$. В низкочастотном диапазоне – интенсивная полоса 976 см^{-1} (C–O), слабые полосы $923, 817, 782$ и дублет $874/866\text{ см}^{-1}$. При растворении кристаллической фруктозы (см. рис. 3, б) спектр поглощения существенно меняется, оставляя неизменным лишь максимум 1048 см^{-1} . В спектре 40%-го раствора фруктозы выделяется тройная полоса $917/896/866\text{ см}^{-1}$, в составе которой полосы 917 и 896 см^{-1} , накладываются на полосы глюкозы 915 и 898 см^{-1} , так же, как и у глюкозы, отвечают колебаниям ее α - и β -пиранозных колец, а полосы 866 и 777 см^{-1} – асимметричным и симметричным колебаниям их C–C-связей. Следует отметить формирование в спектре растворенной фруктозы характерного дублета средней интенсивности – $976/964\text{ см}^{-1}$, также стабильного по положению независимо от концентрации и температуры, который может быть связан с колебаниями C–O связей ее α - и β -пиранозных структур соответственно.

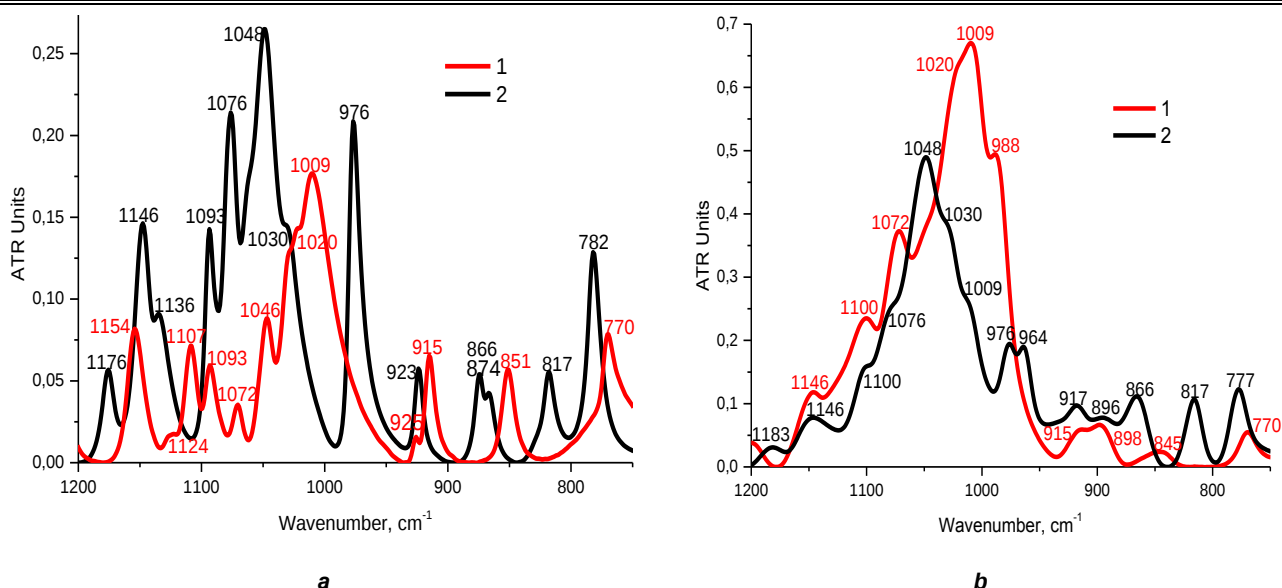


Рис. 3. Фрагменты ИК-спектров моносахаридов в области 1200–750 cm^{-1} :
а – кристаллических; б – 40%-х растворов (20–22 °С); 1 – α-глюкозы, 2 – β-фруктозы

Fig. 3. Fragments of monosaccharides IR-spectra in the region of 1200–750 cm^{-1} :
а – crystalline; б – 40% solutions (20–22 °С); 1 – α-glucose, 2 – β-fructose

Исследование образцов меда методом ИКс НПВО показало существенный разброс оптических характеристик как для полифлерных медов, так и в пределах одного ботанического вида (гречишные, липовые, каштановые, акациевые, донниковые и др.). На примере серии образцов монофлерных гречишных и полифлерных медов разного географического происхождения на рис. 4 представлены типичные для медов фрагменты спектров в области 1175–750 cm^{-1} и отме-

ченный разброс по структуре и форме как глобальной углеводной полосы (1175–950 cm^{-1}), так и серии полос низкой интенсивности в области 950–750 cm^{-1} . Уже первые ИК-спектры медов, независимо от вида, типа и агрегатного состояния, позволили отметить, что общий вид глобальных полос (1175–950 cm^{-1}) в спектрах рассматриваемых медов очень близок по форме к данной полосе в спектрах 40%-х растворов моносахаридов (см. рис. 2, б).

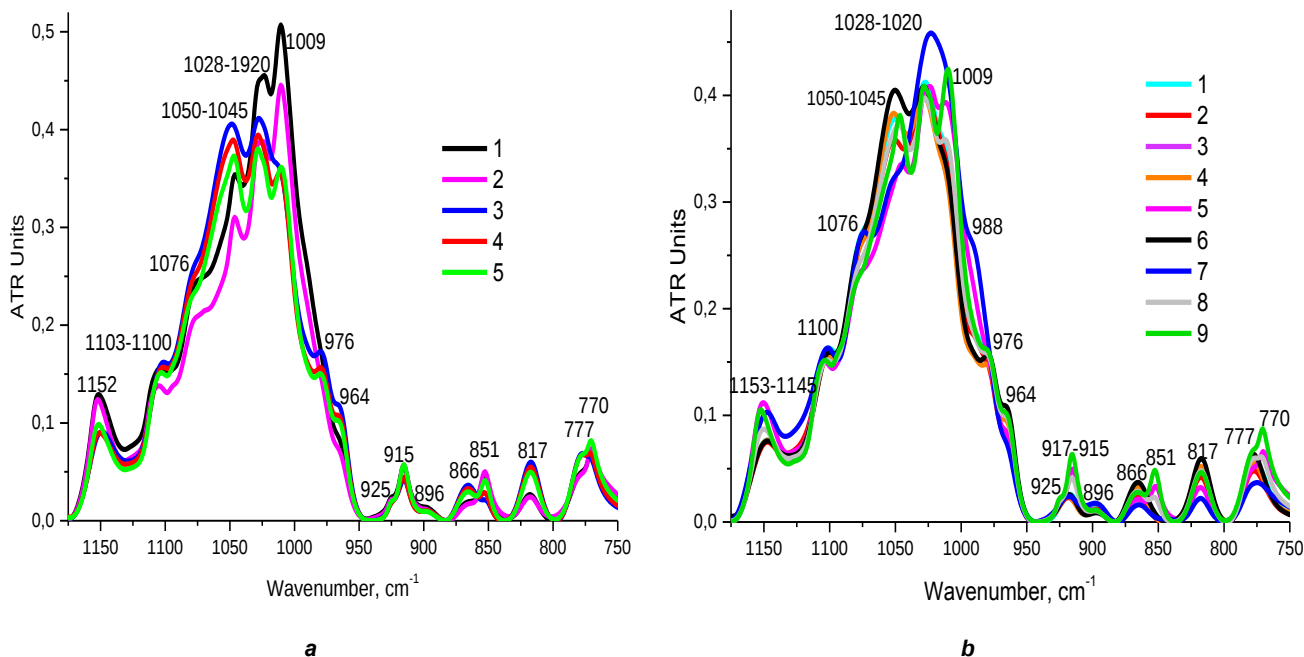


Рис. 4. Фрагменты (1175–750 cm^{-1}) ИК-спектров моно- и полифлерных медов:
а – гречишных; б – полифлерных: 1 – горный, 2 – разнотравье (Псков), 3 – лесной, 4 – майский, 5 – степной, 6 – диких пчел, 7 – цветочный-1, 8 – цветочный-2, 9 – луговой

Fig. 4. Fragments (1175–750 cm^{-1}) of mono- and polyfloral honey IR-spectra:
а – buckwheat; б – polyfloral: 1 – mountain, 2 – grass (Pskov), 3 – wood, 4 – may, 5 – steppe, 6 – wild bees, 7 – flower-1, 8 – flower-2, 9 – meadow

Однако по положению основного максимума и структуре обеих ветвей этой полосы спектры медов существенно отличаются, что особенно заметно по спектрам монофлерных гречишных медов. Высокая интенсивность максимума 1009 см^{-1} для первых двух образцов гречишного меда (рис. 4, а) указывает на преобладающее содержание в них глюкозы. Напротив, в спектрах образцов 3–5 данная полоса падает по интенсивности, но при этом растет интенсивность полосы 1048 см^{-1} на левой ветви, что подтверждает фактическое преобладание фруктозы. Причем с увеличением содержания глюкозы имеет место ее смещение в низкочастотную область из положения 1050 в положение 1045 см^{-1} . Остальные полосы с «плавающими» максимумами на левой ветви глобальной полосы являются общими для спектров всех гречишных медов;

В спектре образца 7 (см. рис. 4, б) полоса $1028\text{--}1020\text{ см}^{-1}$ характерна для жидких медов с повышенным содержанием глюкозы, индивидуальная полоса которой 1009 см^{-1} входит в ее состав, проявляясь выпуклостью правого плеча в этой области; наличие данной полосы в спектре закристаллизованного образца 9 говорит о значительном содержании глюкозы в его составе. В спектрах остальных образцов с повышением содержания фруктозы так же, как и в спектрах аналогичных образцов гречишного меда, снижается поглощение в области 1009 см^{-1} и растет поглощение в области $1050\text{--}1045\text{ см}^{-1}$ со смещением максимума полосы в более высокочастотную часть спектра. Особо следует отметить, что дублет полос, стабильный по своему положению на шкале волновых чисел в спектре раствора фруктозы $976/964\text{ см}^{-1}$ (см. рис. 2, б), в спектрах всех медов неизменно регистрируется в виде проявленных плечей разной интенсивности на правой ветви глобального максимума всех видов меда.

В области $950\text{--}600\text{ см}^{-1}$ наблюдается значительно меньше неоднородности в положении полос, что более наглядно отражают увеличенные фрагменты спектров (рис. 5). В представленных спектрах медов в данной области присутствуют по 3 дублета полос ($917\text{--}915/898\text{--}896$, $866/851$, $777/770\text{ см}^{-1}$) и одна стабильная узкая одиночная и симметричная полоса 817 см^{-1} фруктозы, отсутствующая в спектре глюкозы (см. рис. 2). Однако в отличие от первого дублета ($917\text{--}915/898\text{--}896\text{ см}^{-1}$), отражающего суммарные колебания колец α - и β -пиранозных форм глюкозы и фруктозы, дублеты ($866/851\text{ см}^{-1}$) и ($777/770\text{ см}^{-1}$), с варьируемой интенсивностью полос в их составе, характеризуют колебания их α -пиранозных форм и говорят о том, что в зависимости от соотношения фруктозы и глюкозы в меде меняется соотношение их α -пиранозных форм: α -глюкопиранозы – 851 и 770 см^{-1} , и α -фруктопиранозы – 866 и 777 см^{-1} .

Данное наблюдение и результаты рефрактометрических исследований явились основанием

для разбивки ИК-спектров всей совокупности исследуемых медов на группы в зависимости от преобладания в них глюкозы или фруктозы. При этом ориентиром служил характер максимума 1009 см^{-1} , интенсивность которого, в сопоставлении с интенсивностью полосы 1048 см^{-1} , указывает на преобладание в меде глюкозы или фруктозы. Результаты такой разбивки на примере полифлерных медов представлены на рис. 6. Общий характер спектров медов, в которых преобладает глюкоза (группа I, рис. 6, а), практически не отличается от спектров, приведенных на рис. 5: одинаковый контур полос и положение в спектрах обоих наборов медов (см. рис. 4), а также совпадение их положения с положением в спектрах растворов моносахаридов (см. рис. 2, б). Для большей наглядности в состав данной группы включен спектр меда разнотравья (кр. 5) из группы II, чтобы проиллюстрировать наличие переходной группы медов III. Это лучше всего видно по изменению формы ($777/770\text{ см}^{-1}$): с увеличением в образце содержания глюкозы меняется форма дублета и растет интенсивность полосы 770 см^{-1} .

Для медов с повышенным содержанием фруктозы (рис. 6, б) характер спектров изменился существенно. В них сохранился только дублет $917\text{--}915/898\text{--}986\text{ см}^{-1}$, но уменьшилась его общая интенсивность и соотношение интенсивностей полос в нем. Из дублетов исчезли полосы 851 и 770 см^{-1} α -пиранозной формы глюкозы. Аналогичное явление отмечено при анализе спектров всей выборки полифлерных и монофлерных медов разного ботанического вида, и это несмотря на содержание глюкозы в медах, в любом случае, не менее 30%(!).

Наличие полосы 851 см^{-1} в спектрах медов группы I (характерной для кристаллической глюкозы и отсутствующей в спектре ее раствора), можно объяснить агрегатным состоянием меда, а именно его жидкокристаллической формой. Любой мед рано или поздно кристаллизуется, а жидкокристаллическую форму создают пчелы и время путем сложного комплекса ферментативных процессов жидкого нектара, представляющего собой водный раствор сахаров, собранный с цветов растений, и процессы, сопровождающие его созревание в сотах. Присутствие β -пиранозной формы глюкозы в рассматриваемой группе медов по наличию небольшой полосы при 845 см^{-1} наблюдалось только в спектре образца 5 (цветочный мед, см. рис. 6, б).

Исследования в области $1500\text{--}1175\text{ см}^{-1}$ – области колебаний ОН, CH_2 -группировок, также указывают на возможность идентифицировать образцы медов по принадлежности к группе I (рис. 7, б), переходной III (рис. 7, с) и к группе II (рис. 7, а), а также проследить формирование в этой области шкалы волновых чисел полосы, обусловленной β -пиранозной формой глюкозы. Это удобно рассматривать несколько в иной по-

следовательности. На рис. 7, а, где представлены фрагменты ИК-спектров полифлерных медов группы II, из спектров первых четырех образцов меда видно, что в сложной по структуре полосе 1372–1344 cm^{-1} максимум при 1344 cm^{-1} принадлежит α -фруктопиранозе. Появление полосы с максимумом при 1360 cm^{-1} в спектре образца 5 указывает на присутствие в нем β -пиранозной формы глюкозы, которая в незначительных ко-

личествах присутствует и в составе других образцов, в спектрах которых также намечается полоса 1372 cm^{-1} , принадлежащая α -пиранозной форме глюкозы. Полосой в области 1198 cm^{-1} β -глюкопираноза проявляет себя колебаниями CH_2 -групп спиртовой группировки CH_2OH . В спектрах остальных образцов мы видим полосы, обусловленные колебаниями тех же групп, но пиранозных форм фруктозы (1190–1183 cm^{-1}).

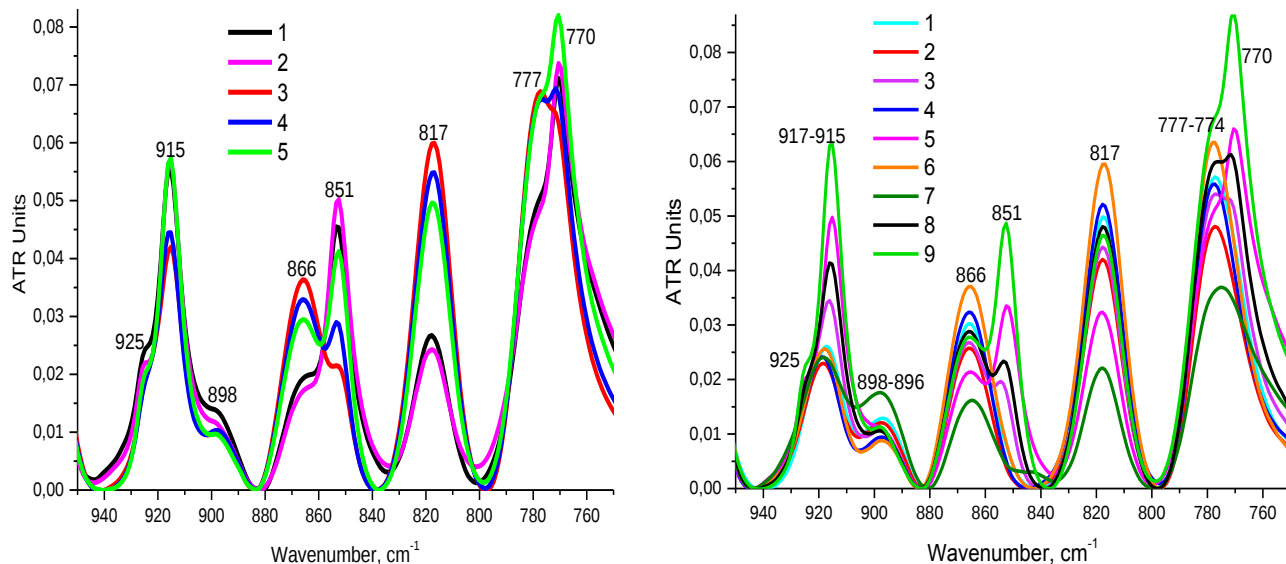


Рис. 5. Фрагменты (950–750 cm^{-1}) ИК-спектров медов: а – монофлерных гречишных; б – полифлерных: 1 – горный, 2 – разнотравье (Псков), 3 – лесной, 4 – майский, 5 – степной, 6 – диких пчел, 7 – цветочный-1, 8 – цветочный-2, 9 – луговой

Fig. 5. Fragments (950–750 cm^{-1}) of honey IR-spectra: а – monofloral buckwheat; б – polyfloral: 1 – mountain, 2 – grass (Pskov), 3 – wood, 4 – may, 5 – steppe, 6 – wild bees, 7 – flower-1, 8 – flower-3, 9 – meadow

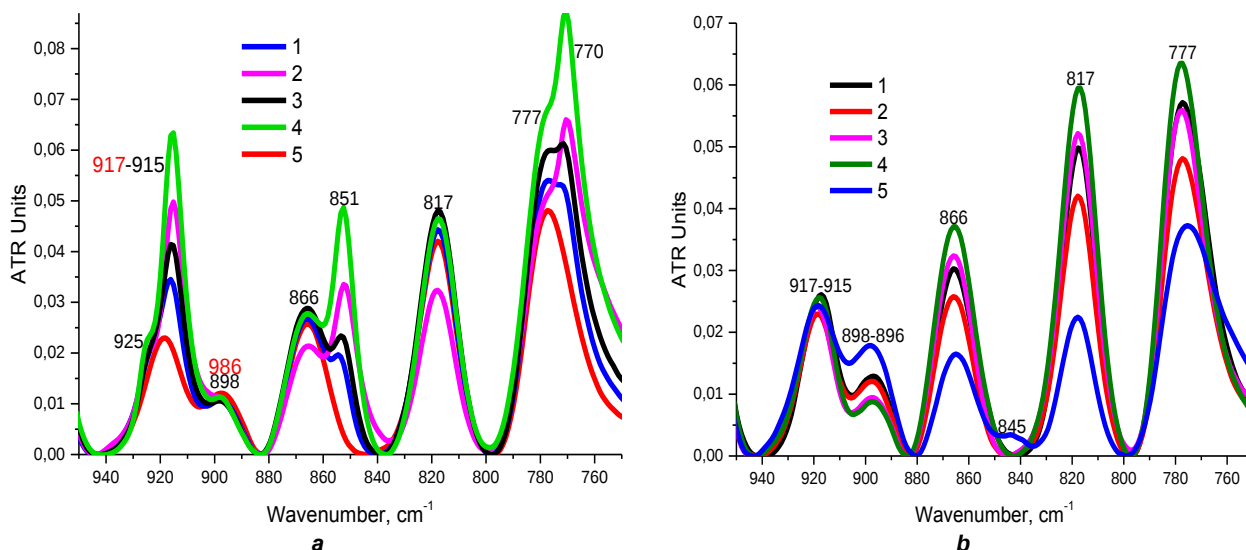


Рис. 6. Фрагменты (950–750 cm^{-1}) ИК-спектров полифлерных медов: а – группа I: 1 – лесной, 2 – степной, 3 – цветочный-2, 4 – луговой, 5 – разнотравье; б – группа II: 1 – горный, 2 – разнотравье, 3 – майский, 4 – диких пчел, 5 – цветочный-1

Fig. 6. Fragments (950–750 cm^{-1}) of polyfloral honey IR-spectra : а – group I: 1 – forest, 2 – steppe, 3 – flower-2, 4 – meadow, 5 – herbs; б – group II: 1 – mountain, 2 – herbs, 3 – may, 4 – wild bees, 5 – flower-1

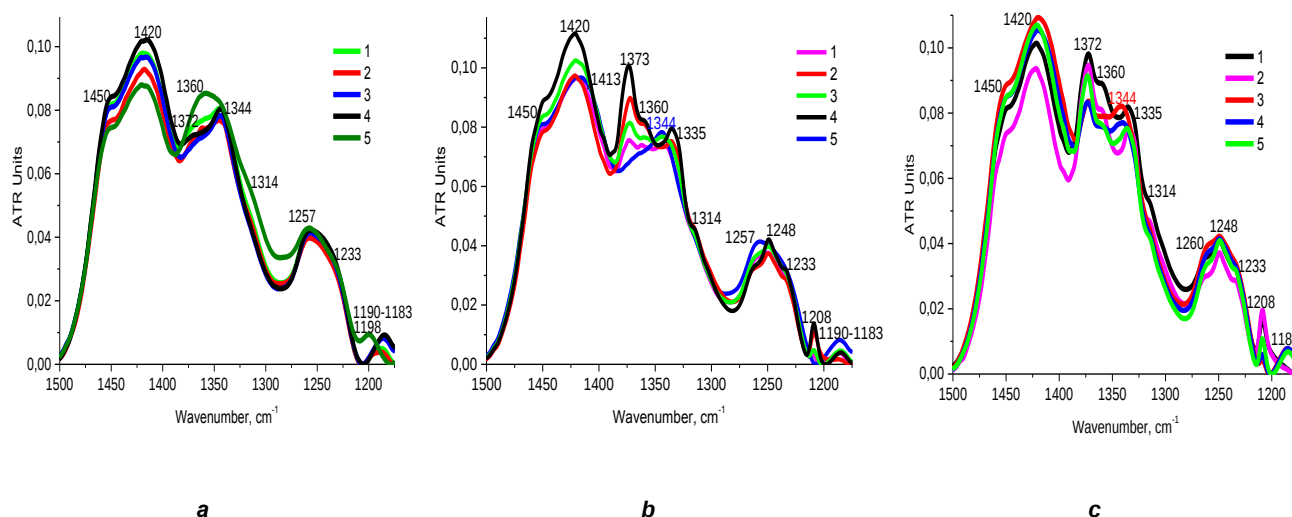


Рис. 7. Фрагменты (1500–1175 cm^{-1}) ИК-спектров медов: полифлерных:
а – группа II: 1 – горный, 2 – разнотравье, 3 – майский, 4 – диких пчел, 5 – цветочный-1;
б – группа I: 1 – лесной, 2 – степной, 3 – цветочный-2, 4 – луговой, 5 – майский; с – гречишных

Fig. 7. Fragments (1500–1175 cm^{-1}) of polyfloral honey IR-spectra:
а – group II: 1 – forest, 2 – steppe, 3 – flower-2, 4 – meadow, 5 – may;
б – group I: 1 – mountain, 2 – herbs, 3 – may, 4 – wild bees, 5 – flower-1; с – buckwheat

Для наглядности в группу I полифлерных медов включен майский мед (гр. II, кр. 5, рис. 7, б), в спектре которого полоса с максимумом 1344 cm^{-1} α -пиранозной формы фруктозы наглядно противопоставляет изменение ее характера с увеличением в образце содержания обеих пиранозных форм глюкозы. Изменения сопровождаются структуризацией ее правой ветви и ростом интенсивности дифференцирующих полос 1372, 1360 и 1335 cm^{-1} с появлением отрицательного экстремума при 1344 cm^{-1} в спектре образца 4. Аналогичные изменения претерпевают рассмотренные полосы в спектрах гречишных медов с варьированием в них соотношения моносахаридов. С увеличением содержания глюкозы замет-

но изменяется и структура полосы 1257 cm^{-1} в спектре майского меда, формируя в ее составе новую тройную полосу с максимумом при 1248 cm^{-1} (рис. 7, б, с). Кроме того, в спектрах этих образцов присутствует небольшой пик 1208 cm^{-1} , обусловленный колебаниями CH_2 -групп α -пиранозной формой глюкозы.

Исследование ряда медов в жидком виде и после кристаллизации показало закономерное и логичное изменение их оптических характеристик. Рис. 8 иллюстрирует изменение в структуре глобальной углеводной полосы в спектрах степного, цветочного и акациевого медов в результате процесса кристаллизации.

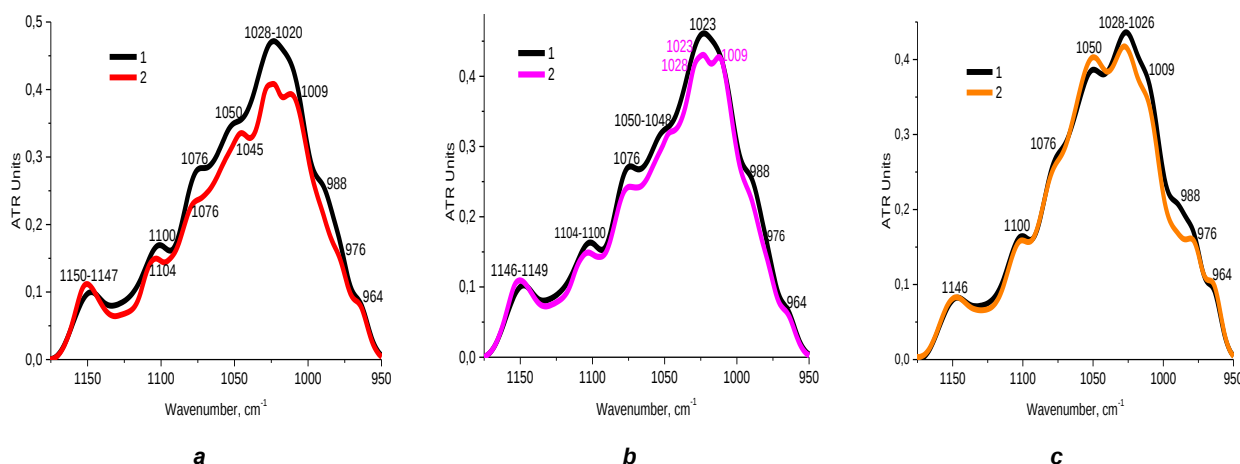


Рис. 8. Фрагменты (1175–950 cm^{-1}) ИК-спектров жидких (1) и закристаллизованных медов (2): а – степного; б – цветочного-2; с – акации белой

Fig. 8. Fragments (1175–950 cm^{-1}) of liquid (1) and crystallized (2) honey IR-spectra:
: а – steppe; б – flower-2; с – white acacia

Наиболее существенные изменения для степного и цветочного мёдов (группа I) – дифференциация максимума глюкозы 1009 см^{-1} из глобальной полосы, в составе которой он проявляется небольшой выпуклостью верхней части ее правой ветви в спектрах мёдов в жидком состоянии, а также общее снижение интенсивности полосы. Для мёда акации белой, напротив, наряду со снижением интенсивности полосы $1028\text{--}1020\text{ см}^{-1}$ наблюдается увеличение полосы фруктозы 1048 см^{-1} . Во всех случаях на ее правой ветви остаются в разной степени проявленными полосы фруктозы – 976 и 964 см^{-1} , а полоса β -пиранозной формы глюкозы 988 см^{-1} из спектра уходит.

На рис. 9 представлены увеличенные фрагменты ИК-спектров в низкочастотной области ($950\text{--}750\text{ см}^{-1}$) жидких и закристаллизованных мёдов. Их анализ также показывает, что слабые полосы β -глюкопиранозы при 845 см^{-1} в спектрах жидких степного и цветочного мёдов при кристаллизации трансформируются в полосу 851 см^{-1} , характерную для α -глюкопиранозы, и снижается интенсивность полосы в области 898 см^{-1} . При этом резко возрастает интенсивность и остальных полос, представляющих α -пиранозную форму глюкозы в данном диапазоне электромагнитного спектра – 915 и 770 см^{-1} . В спектре мёда акации белой при кристаллизации растет интенсивность всех полос, также обусловленных поглощением α -пиранозной формой фруктозы (917 , 866 , 817 , 777 см^{-1}), за исключением полосы в области 896 см^{-1} , где поглощают β -пиранозные формы фруктозы и глюкозы.

Спектры рассматриваемых образцов в области $1500\text{--}1175\text{ см}^{-1}$, приведенные на рис. 10, также достаточно наглядно иллюстрируют изме-

нение оптических свойств мёдов при кристаллизации в зависимости от уменьшения содержания в образцах глюкозы. Во-первых, изменяется наклон полосы $1372\text{--}1344\text{ см}^{-1}$ со смещением максимума 1372 см^{-1} в положение 1344 см^{-1} , во-вторых, исчезает полоса 1208 см^{-1} и характерным образом трансформируется полоса 1257 см^{-1} . В спектре закристаллизованного мёда акации белой она совпадает и имеет форму, типичную для жидких мёдов.

Поскольку в мёдах оба моносахарида присутствуют в молекулярном виде, представилось логичным сопоставить спектр мёда со спектром инвертированного сахара. На рис. 11 приведены фрагменты спектров закристаллизованного мёда разнотравья третьей качки (см. табл. 1, образец № 35) с пасеки И. Е. Кончакова (Оренбургская обл., с. Покровка, 2021 г., порода пчел Карника) и инвертированного сахара *Cremesuc* (Бельгия). Оба образца были близки по консистенции – кремообразные. Анализ их спектров, приведенных на рис. 11, а, показал наличие общих полос и индивидуальных полос, принадлежащих глюкозе (1028 , 1009 см^{-1}) и фруктозе (1050 , 976 , 964 см^{-1}). Все полосы близки по положению, но имеют разную степень проявленности. Спектр мёда расположен несколько выше, что указывает на более высокое содержание в нем суммарных сахаров и более низкую влажность.

Различие образцов в форменном составе моносахаридов в определенной мере показали фрагменты спектров на рис. 11, б. В спектрах и мёда, и инвертсахара доминирует набор полос, обусловленных α -пиранозной формой фруктозы (866 , 777 см^{-1}). Однако в спектре инвертсахара слабо проявлены две полосы (851 , 770 см^{-1}) α -пиранозной формы глюкозы. О ее присутствии

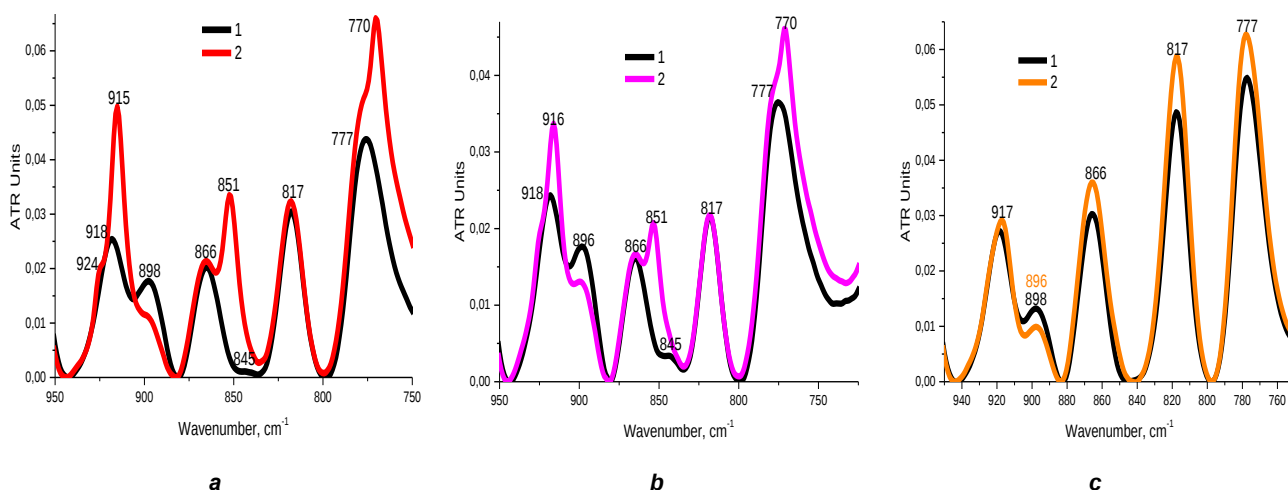


Рис. 9. Фрагменты ($950\text{--}750\text{ см}^{-1}$) ИК-спектров жидких (1) и закристаллизованных мёдов (2): а – степного; б – цветочного (Новгород); с – акации белой

Fig. 9. Fragments ($950\text{--}750\text{ см}^{-1}$) of liquid (1) and crystallized (2) honey IR-spectra: а – steppe; б – flower (Novgorod); с – white acacia

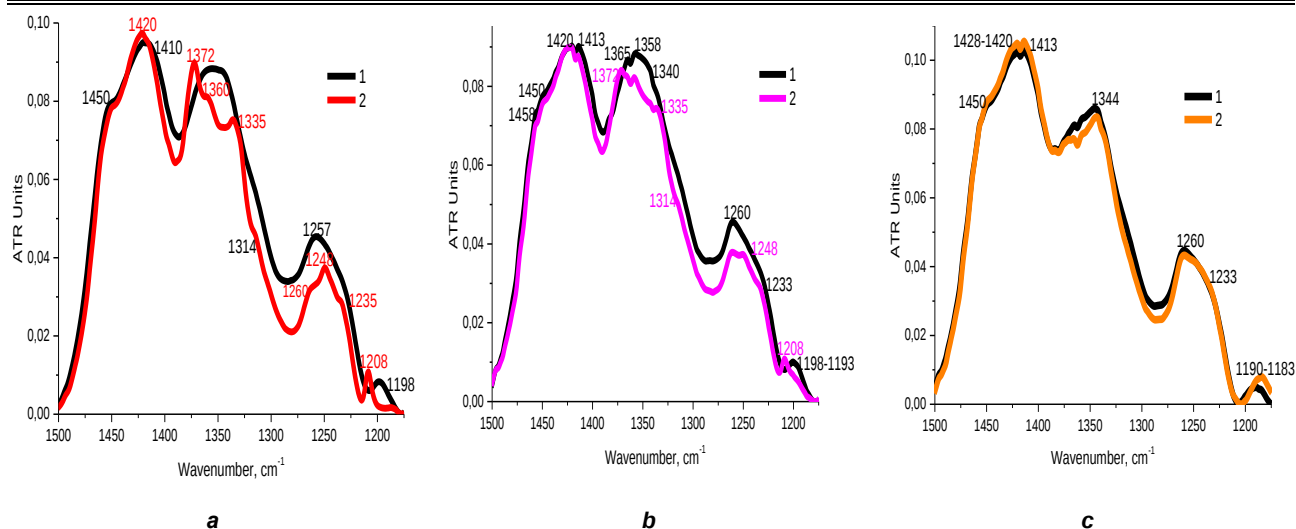


Рис. 10. Фрагменты (1500–1175 cm^{-1}) ИК-спектров жидких (1) и закристаллизованных медов (2): а – степного; б – цветочного-2; с – акации белой

Fig. 10. Fragments (1500–1175 cm^{-1}) of liquid (1) and crystallized (2) honey IR spectra: a – steppe; b – flower-2; c – white acacia

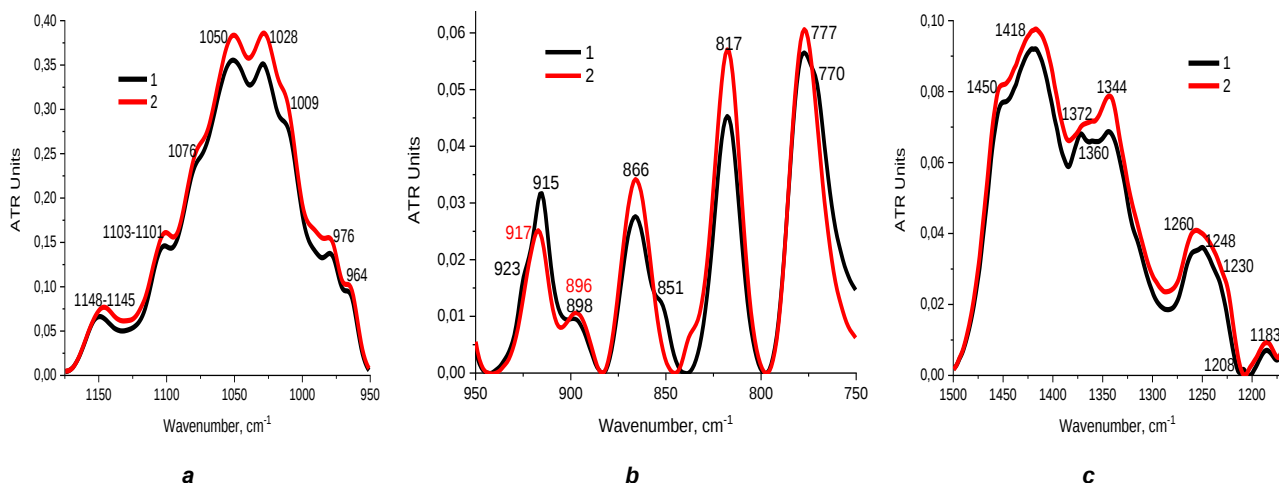


Рис. 11. Фрагменты ИК-спектров: а – 1175–950; б – 950–750; с – 1500–1170 cm^{-1} инвертированного сахара (1) и меда разнотравья (2)

Fig. 11. Fragments of IR spectra: a – 1175–950; b – 950–750; c – 1500–1170 cm^{-1} of inverted sugar (1) and various herbs honey (2)

говорит и положение более интенсивного максимума 915 cm^{-1} в дублете $915/898 \text{ cm}^{-1}$. Не менее интересна информация, предоставленная колебаниями ОН- и CH_2 -групп обоих сравниваемых образцов (рис. 11, с). Структурированная полоса в спектре инвертсахара с близкими по интенсивности максимумами 1372 и 1344 cm^{-1} указывает на равное содержание фруктозы и глюкозы, а слабая полоса при 1360 cm^{-1} говорит о присутствии в нем β -глюкопиранозы. Спектр меда в этом диапазоне определен полосой 1344 cm^{-1} α -фруктопиранозы, полоса 1372 cm^{-1} α -пиранозной формы глюкозы в нем только слабо обозначена. В спектрах обоих образцов выражена полоса 1183 cm^{-1} , обусловленная колебаниями CH_2 -групп фруктозы, но в спектре инвертсахара присутствует очень слабая полоса 1208 cm^{-1} ,

принадлежащая CH_2 -группам α -пиранозной формы глюкозы.

Полученные данные позволяют отметить, что спектрально во всех диапазонах глюкоза начинает проявляться только при содержании, близком к содержанию фруктозы – инвертированный сахар с равным содержанием моносахаридов и третья, переходная группа медов. Преобладание же в медах α -пиранозных форм обоих моносахаридов, возможно, обусловлено тем, что α -пиранозная форма глюкозы характеризует ее кристаллическую структуру, а α -пиранозная форма фруктозы – наиболее устойчивую форму в растворе. Их совместное присутствие, с одной стороны, структурирует и поддерживает жидкокристаллическое состояние меда, с другой – соотношение α -пиранозных форм моносахаридов

обуславливает скорость кристаллизации меда и его гигроскопичность.

ВЫВОДЫ

Исследование методами ИКС НПВО, рефрактометрии и биохимического анализа выборки полифлерных и монофлерных медов разного ботанического вида и районирования позволило подразделить их на три группы в зависимости от соотношения двух основных моносахаридов – глюкозы и фруктозы. Показано, что в медах с преобладанием фруктозы (гр. II) в области $950\text{--}750\text{ см}^{-1}$ присутствуют одиночные полосы 866 и 777 см^{-1} , обусловленные колебаниями пиранозного кольца ее α -формы, устойчивой в растворах. В спектрах медов, в которых преобладает глюкоза (гр. I), формируются полосы 851 и 770 см^{-1} , характерные для ее кри-

сталлической α -пиранозной формы и образующие дублеты с полосами 866 и 777 см^{-1} фруктозы. В спектрах переходной группы медов III интенсивность полос в дублетах меняется в зависимости от количественного соотношения моносахаридов. Аналогичные изменения наблюдались и в области поглощения ОН- и CH_2 -групп пиранозных форм моносахаридов при переходе от одной группы медов к другой.

Отмечено, что присутствие и преобладание обоих моносахаридов в α -пиранозных формах и их соотношение обуславливает не только устойчивость жидкокристаллической структуры медов, скорость их кристаллизации, оптические, биохимические, пищевые свойства, но и важно для приоритетного использования в медицинской и фармакопейной практике, диетологии, косметологии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Хорн Х., Люльманн К. Все о меде. Производство, получение, экологическая чистота и сбыт / пер. с нем. М: АСТ; Астрель, 2011. 316 с.
2. Ахтямов Я. Х., Ахтямов Д. Я. Пчела на наскальном рисунке // Пчеловодство. 2004. N 5. С. 5.
3. Попов Е. Т. Чудесный дар природы // Пчеловодство. 2012. N 10. С.46–47.
4. Реуцкий И. А. Мед как лекарство. М.: Эксмо, 2010. 448 с.
5. Чепурной И. П. Мед и сердечно-сосудистые заболевания // Пчеловодство. 2000. N 3. С. 54–56.
6. Чепурной И. П. Мед и иммунные заболевания // Пчеловодство. 2001. N 1. С. 50–52.
7. Kwakman P. H. S., Zaat S. A. J. Antibacterial components of honey // IUBMB Life. 2012. Vol. 64, no. 1. P. 48–55. <https://doi.org/10.1002/iub.578>.
8. Асафова Н. Н., Орлов Б. Н., Козин Р. Б. Физиологически активные продукты пчелиной семьи: общебиологические и эколого-химические аспекты. Физиологическое обоснование практического применения. Н. Новгород: Изд-во Ю. А. Николаев. 2001, 368 с.
9. Кулаков В. Н., Бурмистров А. Н. Естественные медоносные угодья России // Пчеловодство. 2004. N 8. С. 22–24.
10. Сокольский С. С., Любимов Е. М., Бурмистрова Л. А., Русакова Т. М., Мартынова В. М., Харитонova М. Р. Качество продукции пчел и окружающая среда // Пчеловодство. 2012. N 9. С. 48–50.
11. Комлацкий В. И., Плотников С. А. Химический состав меда от пчел разных пород // Пчеловодство. 2006. N 2. С. 54–56.
12. Гробов О. Ф., Ключко Р. Т. Критерии оценки меда и продуктов пчеловодства – требования ВТО // Пчеловодство. 2004. N 8. С. 5–7.
13. Bogdanov S., Ruoff K., Oddo L. P. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review // Apidologie. 2004. Vol. 35. Number Suppl. 1. P. S4–S17. <https://doi.org/10.1051/apido:2004047>.
14. Андрухова Т. В., Плотников В. А., Пупков К. С. Оптико-спектральный контроль качества меда // Пчеловодство. 2020. N 1. С. 56–59.
15. Svečnjak L, Biliškov N., Bubalo D., Barišić D. Application of infrared spectroscopy in honey analysis // Agriculturae Conspectus Scientificus. 2011. Vol. 76, no. 3. P. 191–195.
16. Lichtenberg-Kraag B., Hedtke C., Bienefeld K. Infrared spectroscopy in routine quality analysis of honey // Apidologie. 2002. Vol. 33, no. 3. P. 327–337. <https://doi.org/10.1051/apido:2002010>.
17. Sotiropoulou N. S., Xagoraris M., Revelou P. K., Kaparakou E., Kanakis Ch., Pappas Ch., et al. The use of SPME-GC-MS IR and Raman techniques for botanical and geographical authentication and detection of adulteration of honey // Foods. 2021. Vol. 10, no. 7. P. 1671–1696. <https://doi.org/10.3390/foods10071671>.
18. Ruoff K., Luginbühl W., Künzli R., Iglesias M. T., Bogdanov S., Bosset J. O., et al. Authentication of the botanical and geographical origin of honey by mid-infrared spectroscopy // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006. Vol. 54, no. 18. P. 6873–6880. <https://doi.org/10.1021/jf060838r>.
19. Tewari J. C., Irudayaraj J. M. K. Floral classification of honey using mid-infrared spectroscopy and surface acoustic wave based z-Nose sensor // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005. Vol. 53, no. 18. P. 6955–6966. <https://doi.org/10.1021/jf050139z>.
20. Буслов Д. К., Никоненко Н. А., Сушко Н. И., Жбанков Р. Г. Анализ структуры полос ИК-спектра β -D-глюкозы регуляризованным методом деконволюции // Журнал прикладной спектроскопии. 2006. Т. 69. N 6. С. 712–718.
21. Стоддарт Дж. Ф. Стереохимия углеводов / пер. с англ.; под ред. Ю. А. Жданова. М.: Мир, 1975. 304 с.

REFERENCES

1. Horn H., Lullmann K. *All about honey. Production, obtaining, environmental cleanliness and marketing*. Moscow: Astrel', 2007. 345 p. (In Russian).
2. Akhtyamov Ya. Kh., Akhtyamov D. Ya. A bee on a rock painting. *Pchelovodstvo*. 2004;5:5. (In Russian).
3. Popov E. T. A wonderful gift of nature. *Pchelovodstvo*. 2012;10:46–47. (In Russian).
4. Reutsky I. A. *Honey as medicine*. Moscow: Eksmo; 2010. 448 p. (In Russian).
5. Chepurnoi I. P. Honey and cardiovascular diseases. *Pchelovodstvo*. 2000;3:54–56. (In Russian).
6. Chepurnoi I. P. Honey and immune diseases. *Pchelovodstvo*. 2001;1:50–52. (In Russian).
7. Kwakman P. H. S., Zaat S. A. J. Antibacterial components of honey. *IUBMB Life*. 2012;64(1):48–55. <https://doi.org/10.1002/iub.578>.
8. Asafova H. H., Orlov B. N., Kozin R. B. *Physiologically active bee products*. N. Novgorod: Izdatel'stvo Yu. A. Nikolaev; 2001. 368 p. (In Russian).
9. Kulakov V.N., Burmistrov A.N. Natural melliferous lands of Russia. *Pchelovodstvo*. 2004;8:22–24. (In Russian).
10. Sokol'skii S. S., Lyubimov E. M., Burmistrova L. A., Rusakova T. M., Martynova V. M., Kharitonova M. R. Bee product quality and the environment. *Pchelovodstvo*. 2012;9:48–50. (In Russian).
11. Komlatskii V. I., Plotnikov S. A. Chemical composition of honey from bees of different breeds. *Pchelovodstvo*. 2006;2:54–56. (In Russian).
12. Grobov O. F., Klochko R. T. Criteria for the evaluation of honey and bee products – WTO requirements. *Pchelovodstvo*. 2004;8:5–7. (In Russian).
13. Bogdanov S., Ruoff K., Oddo L. P. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*. 2004;35:S4–S17. <https://doi.org/10.1051/apido:2004047>.
14. Andrukhova T. V., Plotnikov V. A., Pupkov K. S. Optical spectral quality control of honey. *Pchelovodstvo*. 2020;1:56–59. (In Russian).
15. Svečnjak L., Biliškov N., Bubalo D., Barišić D. Application of infrared spectroscopy in honey analysis. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2011;76(3):191–195.
16. Lichtenberg-Kraag B., Hedtke C., Bienefeld K. Infrared spectroscopy in routine quality analysis of honey. *Apidologie*. 2002;33(3):327–337. <https://doi.org/10.1051/apido:2002010>.
17. Sotiropoulou N. S., Xagoraris M., Revelou P. K., Kaparakou E., Kanakis Ch., Pappas Ch., et al. The use of SPME-GC-MS IR and Raman techniques for botanical and geographical authentication and detection of adulteration of honey. *Foods*. 2021; 10(7): 1671–1696. <https://doi.org/10.3390/foods10071671>.
18. Ruoff K., Luginbühl W., Künzli R., Iglesias M. T., Bogdanov S., Bosset J. O., et al. Authentication of the botanical and geographical origin of honey by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(18):6873–6880. <https://doi.org/10.1021/jf060838r>.
19. Tewari J. C., Irudayaraj J. M. K. Floral classification of honey using mid-infrared spectroscopy and surface acoustic wave based z-Nose sensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(18):6955–6966. <https://doi.org/10.1021/jf050139z>.
20. Buslov D. K., Nikonenko N. A., Sushko N. I., Zhbakov R. G. Analysis of the structure of bands in the IR spectrum of β -D-glucose by the regularized method of deconvolution. *Zhurnal Prikladnoi Spektroskopii*. 2006;69(6):712–718. (In Russian).
21. Stoddart J. F. *Stereochemistry of carbohydrates*. New York and a. o.; 1971. (Russ. ed.: Stoddart DZh. *Stereochemiya uglevodov*. Moscow: Mir; 1975. 304 p.)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

А. П. Нечипоренко,

д.х.н., профессор,
Университет ИТМО,
197101, г. С.-Петербург, Кронверский пр-т, 49,
Российская Федерация,
allanech2512@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8609-9950>

О. С. Везо,

инженер,
Центр диагностики функциональных
материалов для медицины, фармакологии
и нанoeлектроники, Научный парк,
Санкт-Петербургский государственный
университет,
199034, г. С.-Петербург,
Университетская наб., 7-9,
Российская Федерация,
o.vezo@spbu.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4326-8448>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Alla P. Nechiporenko,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
ITMO University,
49, Kronverkskii Ave., St. Petersburg, 191002,
Russian Federation,
e-mail: allanech2512@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8609-9950>

Olga S. Vezo,

Engineer,
Center for Diagnostics of Functional Materials
for Medicine, Pharmacology and Nanoelectronics,
Science Park,
St. Petersburg State University,
7-9, Universitetskaya emb.,
St. Petersburg, 199034,
Russian Federation,
o.vezo@spbu.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4326-8448>

У. Ю. Нечипоренко,
биохимик,
Независимая лаборатория «ИНВИТРО СПб.»,
196106, г. С.-Петербург, ул. Благодатная, 18,
Российская Федерация,
unechiporenko@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4102-1129>

Л. В. Плотникова,
старший научный сотрудник,
Санкт-Петербургский государственный
университет,
199034, г. С.-Петербург,
Университетская наб., 7-9,
Российская Федерация,
ljusja@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3143-7630>

В. Е. Ситникова,
к.х.н., доцент,
Университет ИТМО,
197101, г. С.-Петербург, Кронверкский пр-т, 49,
Российская Федерация,
kresenka@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4753-976X>

П. И. Украинцева,
бакалавр,
Университет ИТМО,
197101, г. С.-Петербург, Кронверкский пр-т, 49,
Российская Федерация,
polina.ukraintseva@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3242-1526>

П. П. Плотников,
магистр,
Санкт-Петербургский государственный уни-
верситет,
199034, г. С.-Петербург,
Университетская наб., 7-9,
Российская Федерация,
petyaplotnikov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4510-2003>

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.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 17.10.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.

Ulyana Yu. Nechiporenko,
Biochemist,
Independent laboratory "INVITRO SPb."
18, Blagodatnaya St.,
St. Petersburg, 196106,
Russian Federation,
unechiporenko@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4102-1129>

Liudmila V. Plotnikova,
Senior Researcher,
St. Petersburg State University,
7-9, Universitetskaya emb.,
St. Petersburg, 199034,
Russian Federation,
ljusja@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3143-7630>

Vera E. Sitnikova,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor ,
ITMO University,
49, Kronverkskii Ave., St. Petersburg, 191002,
Russian Federation,
kresenka@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4753-976X>

Polina I. Ukraintseva,
Bachelor,
ITMO University,
49, Kronverkskii Ave., St. Petersburg, 191002,
Russian Federation,
polina.ukraintseva@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3242-1526>

Petr P. Plotnikov,
Master Student,
St. Petersburg State University,
7-9, Universitetskaya emb.,
St. Petersburg, 199034,
Russian Federation,
petyaplotnikov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4510-2003>

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.*

Information about the article

The article was submitted 17.10.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.

Научная статья

УДК 541.64:547.466

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-642-650>



Роль цистеина в формировании доменных структур папаина и легумина гороха, принимающих участие в ограниченном протеолизе

Юрий Игнатьевич Матвеев*, Елена Витальевна Аверьянова**

*Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля» РАН,

г. Москва, Российская Федерация

**Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова»,

г. Бийск, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Аверьянова Елена Витальевна, averianova.ev@bti.secna.ru

Аннотация. Ограничение использования растительных белков в пищевых целях обусловлено их низкой биодоступностью и плохой перевариваемостью ферментами желудочно-кишечного тракта. Для повышения пищевых качеств белков семян используют метод их модификации, суть которого заключается в частичном воспроизведении ферментативных процессов ограниченного протеолиза, протекающих при прорастании семян. Целью исследования явилось изучение возможности сокращения продолжительности процессов прорастания семян в технологических целях за счет оптимизации условий и параметров ограниченного протеолиза. При этом подбор ферментов (в дополнение к естественным ферментам, содержащимся в семени) и условий протеолиза (в данном случае температуры), а также добавление веществ – активаторов гидролиза, осуществлялся таким образом, чтобы наиболее эффективным способом обеспечить качество конечного продукта. Рассмотрено влияние цистеина на формирование доменных структур белков (ферментов и глобулинов). С помощью предложенных выражений можно определить те части молекул белков, которые образуют устойчивые домены и находятся в неупорядоченном состоянии, подвергаясь воздействию ферментов. На основании исследования физического механизма воздействия папаиноподобных протеолитических ферментов на легумин гороха LegA (3KSC, CAA10722) определены оптимальные условия ограниченного протеолиза и показано, что продолжительность распада вторичных структур белка фактически в 6–8 раз больше, так как водородные связи, возникающие при формировании вторичных структур, ограничивают доступ фермента к соответствующим аминокислотным остаткам. Также показано, что разрушение водородных связей, например, путем предварительной тепловой обработки белка, позволит расширить область ограниченного протеолиза.

Ключевые слова: цистеин, папаин, легумин гороха, домены, неупорядоченные области, температура денатурации, ограниченный протеолиз

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки РФ (мнемокод 0611-2020-013, номер темы – FZMM-2020-0013, ГЗ № 075-00316-20-01).

Для цитирования: Матвеев Ю. И., Аверьянова Е. В. Роль цистеина в формировании доменных структур папаина и легумина гороха, принимающих участие в ограниченном протеолизе // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 642–650. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-642-650>.

Original article

The role of cysteine in the formation of domain structures of papain and legumin in peas, involved in limited proteolysis

Yuri I. Matveev*, Elena V. Averyanova**

*N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS,
Moscow, Russian Federation

**Biysk Technological Institute (branch) of the Altay State Technical University,
Biysk, Russian Federation

Corresponding author: Elena V. Averyanova, averyanova.ev@bti.secna.ru

Abstract. The limited use of plant proteins for food is explained by their low bioavailability and poor digestibility by enzymes of the gastrointestinal tract. Partially reproduced enzymatic processes of limited proteolysis that occur during seed germination are used to modify and improve the edibility characteristics of seed proteins. The present work discusses the possibility of reducing the duration of seed germination processes by optimising the conditions and parameters of limited proteolysis. To optimise manufacturing high-quality final product, enzymes (additional to the natural enzymes in the seed) and proteolysis conditions (in this case, temperature), as well as added substances (hydrolysis activators), were selected. The influence of cysteine on the formation of domain structures of proteins (enzymes and globulins) was evaluated. The proposed expressions can be used to determine those fragments of protein molecules that form stable domains and become unstructured when exposed to enzymes. Optimal conditions for limited proteolysis were identified based on the physical mechanism of action of papain-like proteolytic enzymes on pea legumin LegA (3KSC, CAA10722). It is shown that the decomposition of protein secondary structures takes 6–8 times longer, since the formed hydrogen bonds limit the access of enzymes to the corresponding amino-acid residues. It is also demonstrated that the decomposition of hydrogen bonds, e.g. by preliminary heat treatment of proteins, will broaden the prospects for limited proteolysis.

Keywords: cysteine, papain, pea legumin, domains, unstructured region, denaturation temperature, limited proteolysis

Funding. This work was supported by the project 075-00316-20-01 (FZMMM-2020-0013, mnemonic code 0611-2020-013) from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

For citation: Matveev Yu. I., Averyanova E. V. The role of cysteine in the formation of domain structures of papain and legumin in peas, involved in limited proteolysis. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):642-650. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-642-650>.

ОБОЗНАЧЕНИЯ

N – число аминокислотных остатков;
 N_c – критическая степень полимеризации;
 T_{dn} – температура денатурации;
 $T_{dn,\infty}$ – температура денатурации при молекулярной массе, стремящейся к бесконечности;
 $T_{dn,i}$ – парциальная температура денатурации;
 $T_{des,i}$ – парциальная температура деструкции;
 $\langle T_{dn} \rangle$ – среднее значение температуры денатурации;
 V_p – объем пептида;
 R_p – радиус пептида;
 R_{mv} – радиус микроворсинки.

ВВЕДЕНИЕ

Использование растительных белков для пищевых целей сопряжено с некоторыми проблемами. Так, легумины (11S фракция запасных белков семян зернобобовых и масличных культур) имеют высокую биологическую ценность, но из-за специфического строения, обусловленного компактной жесткой структурой молекул и их

низкой поверхностной гидрофобностью, не полностью перевариваются ферментами желудочно-кишечного тракта.

Для повышения пищевых качеств белков семян используют метод их модификации, суть которого сводится к частичному воспроизведению ферментативных процессов ограниченного протеолиза, протекающих при прорастании семян [1–4] – модификация *in vivo*. В природе время прорастания семян, например, гороха, составляет от 6 до 15 суток при температуре почвы от 6 до 12 °C. Распад запасного белка гороха легумина под действием эндогенных протеиназ начинается на третий день прорастания семян, а на шестой день образуются промежуточные фрагменты белка с молекулярной массой 18–20 кДа, то есть происходит химическое разделение его молекул на отдельные домены. Основными ферментами эндогенного происхождения, действующими на легумин гороха во время прорастания семян, являются легумаин и цистеиновая протеиназа.

Для развития зародыша растения кроме гид-

ролизованного белка необходимы еще и гликозилированные белки, в синтезе которых активное участие принимают эндогенные ферменты (легумаин и цистеиновая протеиназа). В результате гликозилирования происходит разделение доменов 11S белка, и пространство вокруг них освобождается для протеолиза.

Процесс прорастания можно ускорить путем предварительного прогревания семян в течение 5 ч при температуре до 50 °С, а также путем их замачивания на 2–3 ч с последующим проращиванием в течение 2–3 дней во влажной ткани в теплом месте.

При использовании процессов прорастания семян в технологических целях задача заключается в том, чтобы свести продолжительность ограниченного протеолиза к минимуму. При этом подбор ферментов (в дополнение к естественным ферментам, содержащимся в семени) и условий протеолиза (в данном случае температуры протеолиза) осуществляется таким образом, чтобы наиболее эффективным способом обеспечить качество конечного продукта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе на примере протеолитического фермента папаина КФ 3.4.22.2 показано, как можно интенсифицировать процесс прорастания семян в технологических целях в условиях ограниченного протеолиза белка гороха – легумина. Выбор папаина обусловлен тем, что эндогенные протеазы по своему строению и действию на белок очень похожи на папаин, поэтому их называют папаиноподобными протеиназами.

Решить сформулированную задачу можно двумя способами: эмпирическим путем – за счет подбора необходимых компонентов и оптимизации условий протеолиза, либо на основании исследований физического механизма воздействия фермента и химического строения субстрата определить оптимальные пути решения задачи ограниченного протеолиза. В представленной работе рассмотрен второй путь.

Содержание легумина (11S запасной глобулин), выделенного из различных сортов гороха (*Pisum sativum*), по данным скоростной седиментации, составило не менее 95%. На основании данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей молекулярная масса легумина гороха принята 360 кДа [5]. Аминокислотный состав папаина и легумина гороха определен на аминокислотном анализаторе LC-5000 (Biotronik Se & Ko. KG, Германия) по методике, представленной в работе [5].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

О формировании доменных структур в белках. Согласно экспериментальным данным, реальные молекулы белков, в том числе белки

зерновых и зернобобовых культур, имеют число аминокислотных остатков (а.к.о.) N менее N_c (критической степени полимеризации, при которой температура денатурации T_{dn} не зависит от N), то есть на самом деле их T_{dn} должна зависеть от N . Но даже если учесть влияние N на T_{dn} , то полученные расчетные значения будут отличаться от экспериментальных $(T_{dn})_{exp}$ и их может оказаться несколько. Кроме того, $(T_{dn})_{exp}$ разных белков слабо отличаются друг от друга и могут перекрываться значениями T_{dn} других белков (табл. 1). Так, согласно результатам исследования, приведенным в работе [6], если разница температур денатурации (T_{dn}) белков зерна и белков семени составляет $220-164 = 56$ °С при $N > N_c$, то у реальных белков, например, люпина и лизоцима, это значение будет $93-73 = 20$ °С.

Причина реализации более низкой температуры денатурации в легумине гороха и папаине – это образование доменов. Существует определенная группа аминокислотных остатков белков (табл. 2), у которых парциальная температура денатурации, $T_{dn,i}$, выше парциальной температуры деструкции, $T_{des,i}$. Для того чтобы структуры таких белков были устойчивы, они должны иметь определенное пространственное строение [9].

Таким образом, из 9 протеиногенных аминокислот, у которых $T_{des,i} < T_{dn,i}$, только две попадают в реальный диапазон изменения T_{dn} белков – метионин и цистеин. Но если метионин как-то укладывается в этот диапазон температур, то белки, содержащие большое количество цистеина, должны быть явно неустойчивыми в области температур выше 322 К (49 °С) – парциальной температуры деструкции цистеина (см. табл. 2). При этом следует отметить, что на данный факт (использование температуры деструкции цистеина при ускорении прорастания семян гороха) давно обратили внимание практики.

В результате ограниченного протеолиза происходит образование плотных глобул-доменов и рыхлых областей между ними, которые можно рассматривать как опушки этих глобул. При этом активные центры ферментов должны находиться в опушках, и воздействовать ферменты будут на опушки субстрата. Так как опушка субстрата более рыхлая, то в первую очередь действию фермента подвергаются входящие в нее наиболее доступные для фермента пептидные связи. Обычно время завершения ограниченного протеолиза (оптимальная продолжительность гидролиза), по данным измерения оптической плотности, составляет от 60 до 90 мин [10]. На продолжительность протеолиза влияет внесение добавок – биологически активных органических молекул, таких как гуминовые вещества, алкил-гидроксibenзолы (АГБ) и др. [11, 12]. Так, модификация ряда гидролаз с помощью АГБ приводит к

Таблица 1. Температура денатурации (T_{dn}) некоторых белков

Table 1. Denaturation temperature (T_{dn}) of certain proteins

Белок	Температура денатурации, $T_{dn}, ^\circ\text{C}$	Критическая степень полимеризации, N_c	Число аминокислотных остатков, N	Относительное содержание цистеина, Cys
Лизоцим	73	359	129	8/129 = 0,062
Папаин [7, 8]	83	359	212	7/212 = 0,033
Люпин (7S)	93	348	470	9/470 = 0,019
Легумин гороха (11S)	85	359	338	2/294 = 0,007

Таблица 2. Парциальные температуры ($T_{dn,i}$, $T_{des,i}$) протеиногенных аминокислот, имеющих $T_{des,i} < T_{dn,i}$

Table 2. Partial temperatures ($T_{dn,i}$, $T_{des,i}$) of amino acids of proteins having $T_{des,i} < T_{dn,i}$

Аминокислота	Парциальная температура денатурации $T_{dn,i}$, К ($^\circ\text{C}$)	Парциальная температура деструкции $T_{des,i}$, К ($^\circ\text{C}$)
Глицин	898 (625)	531 (258)
Аланин	1141 (868)	533 (260)
Серин	667 (394)	489 (216)
Метионин	527 (254)	367 (94)
Аспарагин	521 (248)	478 (205)
Цистеин	1147 (874)	322 (49)
Аспарагиновая кислота	814 (541)	454 (181)
Глутаминовая кислота	529 (256)	474 (201)
Гистидин	670 (397)	469 (196)

многократному увеличению их активности, изменению субстратной специфичности, расширению температурного и pH-оптимумов гидролиза.

Доменная структура папаина. Папаин является одним из протеолитических ферментов, который преимущественно расщепляет пептидные связи, образованные глицином – Гли (G), лейцином – Лей (L), аргинином – Арг (R), и лизином – Лиз (K) [13, 14]. Папаин относительно устойчив в нейтральной и слабощелочной среде (диапазон pH – 3-12, оптимум pH – 5-8), но быстро и необратимо теряет активность в области кислых значений pH; температурный оптимум составляет 65 $^\circ\text{C}$ [15]. Длина молекулы папаина – 212 а.к.о., масса – 23,406 кДа. Рассмотрим доменную структуру папаина.

На рис. 1 представлена аминокислотная последовательность молекулы папаина. Активные центры – Cys-25 и His-159, находятся на поверхности глобулы, остальные активные центры – в опущках глобул: на N-конце – изолейцин, на C-конце – аспарагин. Количество а.к.о. цистеина в молекуле папаина шесть (на рис. 1 показаны малиновым цветом): $N_1 = 21$; $N_2 = 30$; $N_3 = 31$; $N_4 = 57$; $N_5 = 46$; $N_6 = 12$. Участками между цистеинами, содержащими менее 10 а.к.о., можно пренебречь, полагая, что они не могут образовывать домены.

Оценим температуру денатурации доменов ($T_{dn,i}$), воспользовавшись для T_{dn} выражением из работы [7]:

$$(T_{dn})_i = T_{dn,\infty} - \alpha \cdot N_c / N_i,$$

где $T_{dn,\infty} = 167 ^\circ\text{C}$ (рассчитана для папаина на основании подходов авторов работы [6]).

10	20	30	40
IPEYVDWRQK	GAVTPVKNQG	SCGSCWAFSA	VVTIEGIIKI
50	60	70	80
RTGNLNEYSE	QELLD	CDRRS	YGCNGGYPWS
90	100	110	120
HYRNTYPYEG	VQRY	CRSREK	GPYAAKTGDV
130	140	150	160
LLYSIANQPV	SVVLEAAGKD	FQLYRGGIFV	GPCGNKVDHA
170	180	190	200
VAAVGYPNY	ILIKNSWGTG	WGENGYIRIK	RGTGNSYGV
210			
GLYTSSFYPVKN			

Рис. 1. Последовательность аминокислотных остатков папаина

Fig. 1. Sequence of papain amino acid residues

Так как, согласно [6], у белков $340 \leq N_c \leq 375$, то при дальнейших оценках будем использовать $\langle N_c \rangle = 359$, как у легумина гороха. Величину α найдем из условия, что $T_{dn} = 83 ^\circ\text{C}$ [16] соответствует $N_4 = 57$. Тогда $\alpha = 13,34$ при $N_c = 359$, а $\alpha \cdot N_c = 4789,06$.

По аналогии оценим температуру денатурации для остальных доменов ($T_{dn,i}$), которая соответствует температуре оптимальной активности фермента [14, 15]: $(T_{dn})_1 = -61 ^\circ\text{C}$, $(T_{dn})_2 = 7,35 ^\circ\text{C}$, $(T_{dn})_3 = 12,5 ^\circ\text{C}$, $(T_{dn})_4 = 83 ^\circ\text{C}$, $(T_{dn})_5 = 63 ^\circ\text{C}$, $(T_{dn})_6 = -232 ^\circ\text{C}$. Отрицательные значения ($T_{dn,i}$) свидетельствуют о том, что при $N_i < 30$ образование доменов, скорее всего, невозможно. Доля неупорядоченной части составляет $(N_1 + N_6) / N = 0,15$ (при а.к.о. папаина $N = 212$).

Домены с $(T_{dn})_2 = 7,35 ^\circ\text{C}$, $(T_{dn})_3 = 12,5 ^\circ\text{C}$ не исследовались в папаине, хотя калориметрические измерения в этой области температур могут подтвердить их существование или при их отсутствии позволят наложить дополнительные ограничения на число а.к.о., способных образовать домены. Обычно исследования папаина проводят при температурах $T \geq 20 ^\circ\text{C}$, где эти домены денатурируют и находятся в неупорядоченном состоянии. Тем не менее эта область температур может представлять интерес, так как в реальных условиях прорастание семян (например, гороха) происходит при температурах от 2 до 3 $^\circ\text{C}$, и папаиноподобные эндопротеазы начинают проявлять активность уже в этой области.

Таким образом, в области реально исследуемых температур молекула папаина состоит из двух доменов с температурами денатурации $(T_{dn})_4 = 83^\circ\text{C}$, $(T_{dn})_5 = 63^\circ\text{C}$.

Потеря активности папаина начинается с 55°C [17]. Максимальная температура, при которой сохраняется нативная структура фермента и его активность, называется оптимальной температурой. Термическая стабильность ферментативной активности папаина при 55°C ($\text{pH}=4,0$) обеспечивается в течение 6 мин. Скорость ферментативной реакции увеличивается примерно в два раза с повышением температуры на 10°C . При дальнейшем росте температуры происходит постепенное разрушение фермента, которое приводит к тому, что скорость химического процесса, катализируемого ферментом, замедляется и, наконец, прекращается.

Таким образом, если мы хотим повысить скорость ферментативной реакции, необходимо проводить ее при высоких температурах. В случае папаина это 50°C . Если мы хотим повысить скорость ферментативной реакции в нативной структуре гороха, эта температура должна быть не более 40°C . Последнее связано с тем, что эндогенные протеиназы легумина и цистеиновая протеиназа при температуре выше 45°C инактивируются необратимо.

Доменная структура легумина гороха. Рассмотрим доменную структуру легумина гороха. Согласно [9], его $T_{dn,\infty} = 201^\circ\text{C}$, а $N_c = 359$. Однако, как показывают экспериментальные данные, представленные в работе [5], $\langle T_{dn} \rangle \approx 85^\circ\text{C}$, где $\langle T_{dn} \rangle$ – среднее значение температуры денатурации легуминов гороха различной сортовой принадлежности. Последнее, как это было отмечено выше, связано с образованием доменных структур в белках.

На рис. 2 представлена аминокислотная последовательность молекулы легумина LegA (3KSC, CAA10722), где $N = 496$, $N_c = 359$, подчеркиванием выделены участки последовательности LegA, образующие вторичные структуры, а остатки цистеина, участвующие в формировании дисульфидных связей, показаны красным шрифтом [18].

1
LREQPQONEQLERLDAEPDNIESEGGIETWNPNNKQFRCAVALSRATLOR
NALRRPYYSNAPQEIFIQQNGYFGMVFFGPETFEPEQSEGE - 100
GRYRDRHQKVNRFREDDIAVPTGIVFWMYNDQDTPVIAVSLTDIASSNN
QLDQMPRRFYLAGNHEQEFQYQHQQGGKQEQENEGNNIFSGFKRDFLE - 100
DAFNVRHIVDRLOGRNEDEEKGAIVKVGGLSIISPPEKQAHQRESSQEEDE
DEEKQPRHQGSGRQEEDEDEERQPRHQRRGEEDEEKKERGGS - 100
QCKSRROQDNLLEETVCTAKLRNLNIGPSSSPDYNPEAGRIKTVTSIDLPVLW
LKLSAEHGSLHKNAMFVPHYNLNANSIIYALKGRARTQVNVNNGN - 100
TVFDGELTAGRAITVPQNYAAVAKSISDRFSYVAFKTNDKAGIARTAGTSSVINN
LPIDVVAATFNLQREARQLKSNPNPFKFLVPAESENKASA - 96

Рис. 2. Последовательность аминокислотных остатков LegA (3KSC, CAA10722) [18]

Fig. 2. Sequence of amino acid residues of LegA (3KSC, CAA10722) [18]

Для оценки размеров доменов LegA (3KSC, CAA10722) и характерных температур рассмотрены предложенные выше подходы для папаина.

Аминокислотные остатки цистеина разделяют молекулу LegA (3KSC, CAA10722) на пять областей: $N_1 = 10$; $N_2 = 33$; $N_3 = 43$; $N_4 = 232$; $N_5 = 79$; $N_6 = 99$. Величину α из приведенного выше выражения найдем из условия, что $T_{dn} = 85^\circ\text{C}$, $T_{dn,\infty} = 201^\circ\text{C}$, $N_c = 359$ и $N_4 = 232$. Тогда $\alpha = 74,964$, а соответствующие характерные температуры выделенных областей будут равны: $(T_{dn})_1 = -2490^\circ\text{C}$, $(T_{dn})_2 = -614^\circ\text{C}$, $(T_{dn})_3 = -424^\circ\text{C}$, $(T_{dn})_4 = 85^\circ\text{C}$, $(T_{dn})_5 = -140^\circ\text{C}$, $(T_{dn})_6 = -71^\circ\text{C}$, то есть реализуется один домен с $N_4 = 232$ в диапазоне температур от 0 до 85°C . В указанном диапазоне температур остальные домены теряют устойчивость и находятся в клубкообразном состоянии, образуя опушку домена N_4 . При этом вторичные структуры сохраняются как в опушке, так и в самом домене.

При протеолизе клубков и домена в первую очередь отщепляются а.к.о. G, L, R, K (на рис. 2 они выделены синим цветом), подвергающиеся воздействию активных центров папаина, которые не входят в состав вторичных структур. В результате образуется раствор, в котором будут присутствовать отщепленные а.к.о. (за исключением а.к.о., потерянных вследствие протеолиза), а также оставшиеся части клубков и домена. На рис. 3 и 4 показаны пептиды и а.к.о. домена и клубков, образующихся на начальной стадии воздействия папаина, когда протеолизу подвергаются а.к.о., не входящие во вторичные структуры. У этой оставшейся части молекулы белка структура будет нарушена, так как она распадается до пептидов, которые образуют клубки. Места гидролизированных а.к.о. обозначены тире. Фактически получена смесь пептидов и отдельных а.к.о.

Так как ферменты не расходуются в ходе катализируемой ими реакции, то после распада домена происходит повторное воздействие фермента на изменившуюся среду, в которой а.к.о. G, L, R, K будут входить в состав вторичных структур, замедляя скорость протеолиза. Таким образом, при ограниченном протеолизе легумина гороха наблюдается процесс, который можно охарактеризовать как двухстадийный гидролиз.

Результатом распада вторичных структур под действием папаина в подвздошной кишке является раствор пептидов и а.к.о. Максимальный размер пептидов образуется при распаде вторичных структур домена (рис. 3) и будет состоять из 17 а.к.о. (IVFWMYNDQDTPVIAVS). Так как пептиды сворачиваются в клубки, то, зная объемы а.к.о. [6], можно вычислить объем V_p , он равен $1804 \text{ \AA}^3$, и радиус пептида $R_p = 7,55 \text{ \AA}$. Зная минимальный радиус микроворсинки – $R_{mv} = 4 \text{ мкм}$, $R_{mv}/R_p = 53$, то есть самый большой пептид поместится внутри микроворсинки и будет подвержен действию ее ферментов.

C₈₇PETFEPEQSEQ-E-Y-D-HQ-
VNRFRREGDIIAVPTGIVFWMYNDQDTPFVIAVSITDI-SSNNQ-DQMPRRFYIA-
NHEQEF-QYHQHQGGKQEQENE-NNIFS-F-RDFLEDAFNVRHIVDRLO-
NEDEE-AIVKV-SIISPPE-QA-HQ-E-S-QEEDDEE-QP-HQ-S-
QEEDEDEE-QP-HQ-EEEEED-E-SQ-S-Q-DN-EETV₃₁₉TA₃₂₁

Рис. 3. Аминокислотные остатки домена после действия папаина на аминокислотные остатки, не входящие во вторичные структуры

Fig. 3. Amino acid domain residues after the action of papain on amino acid residues not included in the secondary structures

E₃QPQQNEQLE-DA-EPDNRIESEGGIETWNPNNQFRCAVALSFA
TLQNALRRPYYSNAPQEIFIQNGYFGMVFP₈₅-
L₃₂₃RLNI-SSSPDIYNPEAGRIKTVTS-D-PV-W-
KLSAEHGS₁HNAMFVPHYNANSTIYALKGRRLQVNVN₁GN
TVFDCELEA-RALTVPQNYAVAAKSLSDRFSYVAFKTND-A-IA-A-TSSVINN-
PLDVVAATEN-QRNEARQLKSNPNF₁FTVPA-ESEN-ASA₄₉₆

Рис. 4. Аминокислотные остатки клубков после действия папаина на аминокислотные остатки, не входящие во вторичные структуры

Fig. 4. Amino acid balls residues after the action of papain on amino acid residues not included in the secondary structures

О влиянии вторичных структур на процесс протеолиза легумина. Характерная особенность легумина гороха – это устойчивость к неограниченному протеолизу. Поскольку ограниченный протеолиз легумина гороха обусловлен присутствием вторичных структур, то полный гидролиз легумина может быть достигнут только после разрушения вторичных структур (при нагревании до 60–70 °С, когда происходит разрыв водородных связей). В связи с этим тепловая обработка при приготовлении пищи является наиболее эффективным технологическим приемом для увеличения биодоступности продуктов. Распад вторичных структур до поперечных размеров микроворсинок позволяет повысить эффективность воздействия их ферментов на ранней стадии переваривания пищи в тонком кишечнике.

Как показывают результаты экспериментов, например [10], протеолиз белков во времени состоит из двух периодов. В первый период, длительность которого составляет примерно 30 мин, скорость протеолиза белок-ферментного комплекса имеет максимальное значение для данной системы. Однако при увеличении продолжительности протеолиза его скорость резко уменьшается (в 6–8 раз), что соответствует длительности переваривания белков в тонком кишечнике – от 3,5 до 4,5 ч. Последнее связано с тем, что в начальный момент времени воздействию фермента подвергаются а.к.о., не входящие во вторичные структуры (будем называть их свободными), а после их расщепления фермент

действует на аналогичные а.к.о., входящие во вторичные структуры. Так как в формировании вторичной структуры белка участвуют водородные связи между а.к.о. полипептидной цепи, то доступ фермента к а.к.о., входящим в состав вторичной структуры, будет затруднен.

Согласно рис. 4, количество вторичных структур в домене LegA (3KSC, CAA10722) будет 8. Остальные 12 вторичных структур находятся в опушке. При этом число а.к.о., не входящих во вторичные структуры и подвергающихся действию фермента (показаны синим цветом), составляет 23 в опушке и 49 в домене. Число а.к.о., входящих во вторичные структуры, составляет 48 в опушке и 16 в домене, то есть отношение суммарно числа а.к.о., не входящих во вторичные структуры, к числу а.к.о., входящих во вторичные структуры, будет порядка единицы. Поэтому при продолжительности распада а.к.о., не входящих во вторичные структуры белка, порядка 30 мин [10], продолжительность распада а.к.о. вторичных структур должна иметь тот же порядок.

Однако, фактически продолжительность распада вторичных структур в 6–8 раз больше в силу того, что водородные связи, возникающие при формировании вторичных структур, ограничивают доступ фермента к соответствующим а.к.о. Разрушение водородных связей, например, путем предварительной тепловой обработки белка, позволит расширить область ограниченного протеолиза.

ВЫВОДЫ

Рассмотренный выше подход позволяет на основании аминокислотного состава белков (фермента и/или субстрата) еще на стадии подготовки к эксперименту выявить наиболее существенные моменты ограниченного протеолиза и подобрать соответствующие модифицирующие добавки для наиболее полной его реализации.

Для реализации процесса с максимальной эффективностью необходимо поддерживать температуру гидролиза 40 °С на стадии использования эндогенных протеиназ и до 50 °С – на стадии использования папаина и биологически активных добавок.

В общем случае температура протеолиза будет определяться оптимальной температурой активности фермента. Дальнейшего сокращения продолжительности гидролиза можно добиться путем использования биологически активных органических молекул (гуминовых веществ и алкилгидроксibenзолов (АГБ)). Модификация ряда гидролаз с помощью АГБ приводит к многократному увеличению их активности, изменению субстратной специфичности, расширению температурного и pH-оптимумов гидролиза [11].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Кердиварэ А. М. Ограниченный протеолиз как способ снижения аллергенности запасных глобулинов семян (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53, N 3. С. 475–484. <https://vuzbiochemi.elpub.ru/jour>

doi.org/10.15389/agrobiology.2018.3.475rus.

2. Шутов А. Д., Королева Т. Н., Вайнтрауб И. А. Об участии протеаз покоящихся семян вики в распаде запасных белков при прорастании // Физиология растений. 1978. Т. 25, N 4. С. 735–742.

3. Рудакова А. С., Каховская И. А., Шутов А. Д. Легумины, Асп-специфичные протеиназы растений: филогенетический анализ и функции // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: материалы XIII Междунар. конф. (Сочи, 4–8 июня 2018 г.). М.: Изд-во РУДН, 2018. N 13. С. 306–310.

4. Cherdivară A., Rudakova A., Stepurina T., Rudakov S., Wilson K., Shutov A. Limited proteolysis initiates massive degradation of ginnacin, storage 11S globulin from *Ginkgo* seeds // Molecular Life. 2018. Vol. 2, no. 1. 6 p. <https://doi.org/10.26600/MolLife.1.2.1.2018>.

5. Даниленко А. Н., Поляков А. В., Плащина И. Г., Павловская Н. Е. Сравнительный анализ интегральной гидрофобности легуминов гороха различной сортовой принадлежности // Вестник ОрелГАУ. 2013. N 1 (40). С. 77–83.

6. Матвеев Ю. И. Определение температур перехода в вязкотекучее состояние, денатурации и начала интенсивной деструкции белков в зависимости от их химического строения // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 1997. Т. 39, N 4. С. 690–698.

7. Matveev Yu. I., Plashchina I. G. Determination of the main structural parameters of lysozyme that affect its enzymatic activity // Polymer Science. Series A. 2010. Vol. 52, no. 6. P. 610–613. <https://doi.org/10.1134/S0965545X10060064>.

8. Choudhury D., Biswas S., Roy S., Dattagupta J. K. Improving thermostability of papain through structure-based protein engineering // Protein Engineering, Design and Selection. 2010. Vol. 23, no. 6. P. 457–467. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq016>.

9. Лифшиц И. М., Гроссберг А. Ю. Диаграмма состояний полимерной глобулы и проблема самоорганизации ее пространственной структуры // Успехи физических наук. 1974. Т. 113, N 6. С. 331–334. <https://doi.org/10.3367/UFNr.0113.197406f.0331>.

10. Браудо Е. Е., Даниленко А. Н., Елисеева Л. Г., Махотина Н. А. Повышение пищевой ценности белков люпина методом ограниченного фермен-

тативного гидролиза // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2006. Т. 54, N 2-3. С. 69–70.

11. Матвеев Ю. И., Плащина И. Г. Динамическая модель воздействия метилрезорцина на ферментативную активность лизоцима // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2011. Т. 53, N 5. С. 696–703.

12. Матвеев Ю. И., Плащина И. Г. Влияние степени полимеризации фермента и субстрата на каталитическую активность фермента // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2012. Т. 54, N 9. С. 1396–1409.

13. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты: монография. М.: Наука, 1971. 412 с.

14. Королева В. А., Холявка М. Г., Артюхов В. Г. Оценка субстратной специфичности растительных цистеиновых протеаз, свободных и иммобилизованных на матрице хитозана // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2020. N 4. С. 50–56.

15. Поляков А. В. Модифицирующее действие ограниченного протеолиза папаином на структуру и свойства легуминов // Биохимическая физика: труды XVI Ежегодной международной молодежной конференции (Москва, 24–26 октября 2016 г.). М.: Изд-во Российского университета дружбы народов (РУДН), 2017. С. 163–167.

16. Sathish H. A., Kumar P. R., Prakash V. Mechanism of solvent induced thermal stabilization of papain // International Journal of Biological Macromolecules. 2007. Vol. 41, no. 4. P. 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.05.009>.

17. Sumner I. G., Harris G. W., Taylor M. A. J., Pickersgill R. W., Owen A. J., Goodenough P. W. Factors effecting the thermostability of cysteine proteinases from *Carica papaya* // European Journal of Biochemistry. 1993. Vol. 214, no. 1. P. 129–134. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17904.x>.

18. Tandang-Silvas M. R. G., Fukuda T., Fukuda C., Prak K., Cabanos C., Kimura A., et al. Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics. 2010. Vol. 1804, no. 7. P. 1432–1442. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.02.016>.

REFERENCES

1. Cherdivară A. M. Limited proteolysis as a means to reduce the allergenicity of seed storage globulins (review). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology*. 2018;53(3):475–484. (In Russian). <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.3.475rus>.

2. Shutov A. D., Koroleva T. N., Weintraub I. A. On the participation of proteases of dormant vetch seeds in the breakdown of storage proteins during germination. *Fiziologiya rastenii*. 1978;25(4):735–742. (In Russian).

3. Rudakova A. S., Kakhovskaya I. A., Shutov A.D.

Legumines, Asn-specific plant proteases: phylogenetic analysis and function. In: *Novye i netraditsionnye rasteniya i perspektivy ikh ispol'zovaniya: Materialy XIII Mezhdunarodnoi konferentsii = New and unconventional plants and prospects for their use: Proceedings of XIII International Conference*, 4–8 June 2018, Sochi. Moscow: RUDN University; 2018;13:306–310. (In Russian).

4. Cherdivară A., Rudakova A., Stepurina T., Rudakov S., Wilson K., Shutov A. Limited proteolysis initiates massive degradation of ginnacin, storage 11S

globulin from *Ginkgo* seeds. *Molecular Life*. 2018;2(1). 6 p. <https://doi.org/10.26600/MolLife.1.2.1.2018>.

5. Danilenko A. N., Polyakov A. V., Plashchina I. G., Pavlovskaya N. E. Comparative analysis of the integral hydrophobicity of legumins of peas of various varietal types. *Vestnik OrelGAU*. 2013;1:77–83. (In Russian)

6. Matveev Yu. I. Determination of the temperatures of the transition into the viscoelastic state, denaturation, and the onset of intensive destruction of proteins with various structures. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya A = Polymer Science. Series A*. 1997;39(4):690–698. (In Russian).

7. Matveev Yu. I., Plashchina I. G. Determination of the main structural parameters of lysozyme that affect its enzymatic activity. *Polymer Science. Series A*. 2010;52(6):610–613. <https://doi.org/10.1134/S0965545X10060064>.

8. Choudhury D., Biswas S., Roy S., Dattagupta J. K. Improving thermostability of papain through structure-based protein engineering. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2010;23(6):457–467. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq016>.

9. Lifshits I. M., Grosberg A. Yu. The phase diagram of the polymer globule and the problem of self-organization of its spatial structure. *Uspekhi fizicheskikh nauk = Physics-Uspekhi (Advances in Physical Sciences)*. 1974;113(6):331–334. (In Russian). <https://doi.org/10.3367/UfNr.0113.197406f.0331>.

10. Braudo E. E., Danilenko A. N., Eliseeva L. G., Makhotina N. A. Increasing the nutritional value of lupine proteins by limited enzymatic hydrolysis. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Pishchevaya tekhnologiya = Food Technology*. 2006;54(2-3):69–70. (In Russian).

11. Matveev Yu. I., Plashchina I. G. Dynamic model of the effect of methylresorcinol on the enzymatic activity of lysozyme. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya A = Polymer Science. Series A*. 2011;53(5):696–703. (In Russian).

12. Matveev Yu. I., Plashchina I. G. Influence of the degree of polymerization of the enzyme and substrate on the catalytic activity of the enzyme. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya A = Polymer Science. Series A*. 2012;54(9):1396–1409. (In Russian).

13. Mosolov V. V. *Proteolytic enzymes*. Moscow: Nauka; 1971. 412 p. (In Russian).

14. Koroleva V. A., Holyavka M. G., Artyukhov V. G. Estimation of substrate specificity of plant cysteine proteases, free and immobilized on the chitosan matrix. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2020;4:50–56. (In Russian).

15. Polyakov A. V. Modifying effect of limited papain proteolysis on the structure and properties of legumins. In: *Biokhimicheskaya fizika: trudy XVI Ezhegodnoi mezhdunarodnoi molodezhnoi konferentsii = Biochemical Physics: Proceedings of the XVI Annual International Youth Conference*. 24–26 October 2016, Moscow. Moscow: RUDN University; 2017, p. 163–167. (In Russian).

16. Sathish H. A., Kumar P. R., Prakash V. Mechanism of solvent induced thermal stabilization of papain. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007;41(4):383–390. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.05.009>.

17. Sumner I. G., Harris G. W., Taylor M. A. J., Pickersgill R. W., Owen A. J., Goodenough P. W. Factors effecting the thermostability of cysteine proteinases from *Carica papaya*. *European Journal of Biochemistry*. 1993;214(1):129–134. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17904.x>.

18. Tandang-Silvas M. R. G., Fukuda T., Fukuda C., Prak K., Cabanos C., Kimura A., et al. Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*. 2010;1804(7):1432–1442. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.02.016>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ю. И. Матвеев,

к.ф.-м.н., старший научный сотрудник,
Институт биохимической физики
им. Н.М. Эммануэля РАН,
117997, г. Москва, ул. Косыгина, 4,
Российская Федерация,
yu.matveev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4670-9846>

Е. В. Аверьянова,

к.х.н., доцент,
Бийский технологический институт
(филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный технический университет
им. И.И. Ползунова»,
659305, г. Бийск, ул. им. Героя Советского

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yuri I. Matveev,

Cand. Sci. (Physics and Mathematics),
Senior Scientist,
N.M. Emanuel Institute of Biochemical
Physics RAS,
4, Kosygin St., Moscow, 117997,
Russian Federation,
yu.matveev@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4670-9846>

Elena V. Averyanova,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Department of Biotechnology,
Biysk Technological Institute (branch)
of the Altay State Technical University,
27, Hero of the Soviet Union Trofimov St.,
Biysk, 659305,

Союза Трофимова, 27,
Российская Федерация,
averianova.ev@bti.secna.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2144-1238>

Russian Federation,
averianova.ev@bti.secna.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2144-1238>

Вклад авторов

Оба автора 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.*

*Поступила в редакцию 28.05.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.*

*The article was submitted 28.05.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.*

Научная статья
УДК 602.4:546.92

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-651-662>



Синтез, антимикробная и антифунгицидная активность комплексов платины (II) и палладия (II)

Олеся Владимировна Салищева, Александр Юрьевич Просеков,
Наталья Евгеньевна Молдагулова, Валерий Михайлович Пугачев

Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Салищева Олеся Владимировна, salishchevaov@mail.ru

Аннотация. Целью работы являлись синтез и исследование биологической активности моноядерных и биядерных комплексов платины (II) и палладия (II), содержащих концевые и мостиковые нитрит-лиганды, в отношении тест-культур *Bacillus subtilis* B4647, *Aspergillus brasiliensis* (niger) F679, *Pseudomonas aeruginosa* B8243, *Escherichia coli*. Путем взаимодействия моноядерных комплексов платины (II) и палладия (II) синтезированы димерные комплексы с нитритными лигандами. Состав и строение комплексов были установлены методами элементного анализа, кондуктометрии, потенциометрии, криоскопии, ИК-спектроскопии, рентгенофазового и рентгенофлуоресцентного анализа. Установлен способ координации нитритных лигандов с центральным атомом. Антимикробные и противогрибковые свойства оценивали по способности синтезированных комплексов подавлять жизнедеятельность бактерий и грибов методом диффузии в агаре и методом разведения в пробирке. Значения минимальной ингибирующей концентрации и минимальной бактерицидной концентрации комплексов, при которых наблюдается подавление видимого роста микроорганизмов и грибов и бактерицидный эффект действия комплексов, варьировались в диапазоне 62,5–125 мкмоль/дм³. Полученные результаты показали высокую активность биядерного комплекса палладия (II) неэлектролитного типа и биядерного комплекса платины (II) катионного типа. Биядерные комплексы платины и палладия в отличие от моноядерных проявляют более высокую антибактериальную активность. Эффективность антибактериального действия комплекса-неэлектролита палладия в отношении бактерий *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* и грибов *Aspergillus niger* была более выраженной. Исключение составляет антимикробная активность комплекса палладия в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, которая сопоставима с активностью катионного биядерного комплекса платины. Изменяя структуру комплекса, состав и заряд внутренней сферы, число координационных центров, природу и дентатность лигандов, можно достичь более высокого токсического эффекта комплексов в отношении бактерий и грибов.

Ключевые слова: комплексы платины, комплексы палладия, нитритные лиганды, антимикробные свойства

Для цитирования: Салищева О. В., Просеков А. Ю., Молдагулова Н. Е., Пугачев В. М. Синтез, антимикробная и антифунгицидная активность комплексов платины (II) и палладия (II) // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 651–662. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-651-662>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Platinum (II) and palladium (II) complexes: synthesis, antimicrobial and antifungal activity

Olesya V. Salishcheva, Alexander Yu. Prosekov,
Natalya E. Moldagulova, Valery M. Pugachev

Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

Corresponding author: Olesya V. Salishcheva, salishchevaov@mail.ru

Abstract. The study aims to synthesize and examine the biological activity of mono- and binuclear platinum (II) and palladium (II) complexes containing terminal and bridging nitrite ligands against the test cul-

tures of *Bacillus subtilis* B4647, *Aspergillus brasiliensis* (niger) F679, *Pseudomonas aeruginosa* B8243, and *Escherichia coli*. Through the interaction of mononuclear platinum (II) and palladium (II) complexes, dimeric complexes having nitrite ligands were synthesized. The composition and structure of these complexes were established using elemental analysis, conductometry, potentiometry, cryoscopy, infrared spectroscopy, X-ray diffraction analysis, and X-ray fluorescence analysis. A way to coordinate nitrite ligands with the central atom was established. Antimicrobial and antifungal properties were evaluated according to the capability of the synthesized complexes to inhibit the activity of bacteria and fungi via diffusion in agar and in vitro dilution. The minimum inhibitory and bactericidal concentrations of the complexes suppressing the visible growth of microorganisms and fungi, as well as exhibiting their bactericidal effect, ranged from 62.5–125 $\mu\text{mol/dm}^3$. The obtained results revealed a high activity of the palladium (II) binuclear complex of the non-electrolytic type and the platinum (II) binuclear complex of the cationic type. Unlike mononuclear complexes, palladium and platinum binuclear complexes demonstrate higher antibacterial activity. Antibacterial effectiveness exhibited by the palladium complex of the non-electrolytic type against bacteria *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, as well as fungi *Aspergillus niger*, is more pronounced. The only exception is the antimicrobial activity of the palladium complex against *Pseudomonas aeruginosa*, which is comparable to that of the binuclear platinum complex of the cationic type. By changing the structure of the complex, the composition and charge of the inner sphere, the number of coordination centers, as well as the nature and denticity of ligands, it is possible to achieve a higher toxic effect of the complexes against bacteria and fungi.

Keywords: platinum complexes, palladium complexes, nitrite ligands, antimicrobial properties

For citation: Salishcheva O. V., Prosekov A. Yu., Moldagulova N. E., Pugachev V. M. Platinum (II) and palladium (II) complexes: synthesis, antimicrobial and antifungal activity. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):651-662. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-651-662>.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших проблем современности остается противостояние человека различным вирусам и бактериям, представляющим большую опасность не только для здоровья и жизни людей, но и для различных экосистем. Вследствие высокой резистентности микроорганизмов сегодня нельзя довольствоваться достигнутыми результатами в области получения и применения антибактериальных веществ [1]. В последние годы воздействие лекарственной терапии осознается как чрезвычайно важная проблема не только в медицинском плане, но и в экологическом; улучшение качества медицинской помощи, повышение ее эффективности должно сочетаться с безопасностью фармакотерапии, реальной оценкой влияния лекарств как химических факторов воздействия на биоценоз человека и экологию среды обитания. Особенно это относится к антибактериальным препаратам, которые могут менять чувствительность микроорганизмов, способствовать формированию их резистентности, трансформировать локальный «микробный пейзаж» и экологическую среду [2]. Поэтому необходим постоянный мониторинг антибактериальной лекарственной терапии, нужно синтезировать новые антимикробные агенты, которые можно создать доступным, быстрым и экологичным способом. Благодаря высокой биологической активности, относительно низкой себестоимости и экологической безопасности наночастицы металлов являются весьма перспективными для разработки антибактериальных средств.

Металлы в наносостоянии и соединения металлов проявляют ярко выраженные антимикробные свойства. Так, например, наночастицы благо-

родных металлов обладают бактерицидными свойствами, химически стабильны, нетоксичны и биосовместимы, что делает их перспективным материалом для разработки современных медико-биологических препаратов и изделий [3]. Вследствие малых размеров они способны проникать сквозь клеточные мембраны, влиять на внутриклеточные процессы изнутри, проявляя при этом антимикробные свойства [4, 5].

Открытие цисплатина в качестве противоопухолевого агента привлекло внимание к направленному дизайну комплексов металлов, которые потенциально могут быть использованы в химиотерапии. «Фармацевтическая промышленность ежегодно инвестирует более 1 млрд долларов в разработку новых препаратов на основе металлов для улучшения биологической активности с точки зрения клеточной селективности, терапевтической эффективности и минимизации побочных эффектов» [6]. Химиотерапия на основе переходных металлов играет ключевую роль в лечении онкологических заболеваний, и среди всех исследуемых металлов платина и палладий являются наиболее эффективными.

Уже синтезированы многочисленные комплексы на основе ионов платины (II) и палладия (II), для которых получены результаты исследований их антимикробной активности [7–12]. Среди них азотсодержащие комплексы, признанные биологически активными соединениями, проявляющими большую ДНК-связывающую и антимикробную активность [13].

При исследовании взаимодействия ДНК с полиядерными хелатами Pd(II), содержащими биогенные полиамины [14], было обнаружено, что комплексы вызывают большие морфологические

изменения в конформации ДНК по сравнению со свободными лигандами. Специфическое взаимодействие вызывает искажение и локальную денатурацию структуры ДНК с высвобождением оснований гуанина.

Химические свойства моноядерных комплексов палладия (II) схожи со свойствами комплексов платины (II), но высокая скорость обмена лигандов с центральным атомом Pd (в 10^5 раз по сравнению с Pt) вызывает протекание процессов гидролиза, приводящих к диссоциации комплекса и образованию различных аква- и гидроксокомплексов, не способных достичь своих биологических целей [15].

В работе [16] описаны комплексы Pd(II) с 7-бромхинолин-8-олом (L), координированным N, O-донорными атомами состава $[Pd(L)_2]$ и $[PdCl_2L]$. Антимикробная активность комплексов протестирована путем определения минимальной ингибирующей концентрации и минимальной бактерицидной концентрации против 9 штаммов бактерий и 5 штаммов грибов. Активность комплексов в отношении *Proteus mirabilis* более чем в 250 раз выше, чем у свободного лиганда L. С помощью УФ-спектроскопии и флуоресцентной спектроскопии показано, что комплексы взаимодействуют с ДНК через механизм интеркаляции.

Синтезированы хелатные комплексы палладия (II) с лекарственным средством Офлоксацин (OFL) второго поколения и двумя аминокислотами – глицином и аланином, где хелат OFL действует как бидентатный через атомы азота пиперазинового кольца, аминокислоты образуют хелатный цикл за счет координации через атом азота аминогруппы и кислорода карбоксильной группы [17]. Антибактериальная активность комплексов исследована в отношении *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, причем комплексы показали большую активность по сравнению со свободным лигандом.

Авторами работы [18] синтезированы биядерные комплексы Pt(II) с N, N-координированными лигандами 5-перфторалкил-1,2,4-оксадиазолилпиридина и 3-перфторалкил-1-метил-1,2,4-триазолилпиридина и мостиковыми атомами хлора $[PtCl(pfbap)_2]_2(\mu-Cl)_2$, $[Pt_2(\mu-Cl)_2(pfbap)_4]Cl_2$, проявляющие антимикробную активность в отношении *Escherichia coli*, *Kocuria rhizophila* и двух штаммов *Staphylococcus aureus*.

В работе [19] описан синтез биядерных комплексов Pt(II) и Pd(II) с лигандом 2,2'-дитиобисбензотиазолом (DTBTA) $[Pd_2(\mu-Cl)_2(DTBTA)_2]Cl_2$. Авторами изучена антимикробная активность против *Escherichia coli* и *Kocuria rhizophila*. Комплексы проявляют большую антимикробную активность против роста грамположительных бактерий, чем цисплатин. Низкая активность в отношении грамотрицательных бактерий обусловлена наличием дополнительной наружной мембраны в этой груп-

пе бактерий, что может препятствовать поглощению обоих соединений.

В работе [20] описаны синтез и структурные характеристики противоракового препарата на основе платины (IV), известного как CPA-7, представляющего собой соединение $fac[PtCl_3(NO_2)(NH_3)_2]$. Широкое исследование CPA-7 связано с его способностью контролировать рост опухолевых клеток путем ингибирования передачи сигналов активатора транскрипции и сигнального белка Stat3.

Высокая биологическая активность нитрозамещенных соединений проявляется за счет наличия в комплексах высокоэлектронной компоненты нитрогруппы. «Присутствие NO_2 -группы действует не только как химические изостеры для атомов кислорода в гетероциклическом основании тимидина, но и участвует в «сильной» O–H-связи, в результате чего проявляется большая ДНК-связывающая и антимикробная активность этих комплексов» [13].

Нитрит-ион является амбидентатным лигандом и может координироваться за счет донорных атомов азота и кислорода, образуя с ионами переходных металлов многочисленные координационные соединения: нитрокомплексы с монодентатной координацией за счет атомов азота нитрогруппы; нитритокомплексы с монодентатной координацией за счет атомов кислорода; хелатные комплексы с бидентатной координацией за счет двух атомов кислорода, и мостиковые, с одновременным присоединением к двум атомам металла.

Нитрогруппа в комплексах платины координирована через азот, а благодаря высокой прочности и инертности связи платины с азотом исключается возможность ее изомеризации в комплексах. Ранее был разработан метод направленного синтеза биядерных комплексов платины с различными мостиковыми лигандами, с его помощью получена серия комплексных соединений платины и палладия с мостиковыми лигандами [21].

Целью настоящей работы являлись синтез и исследование биологической активности моноядерных и биядерных комплексов платины (II) и палладия (II), содержащих концевые и мостиковые нитрит-лиганды, в отношении тест-культур *Bacillus subtilis*, *Aspergillus brasiliensis* (niger), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

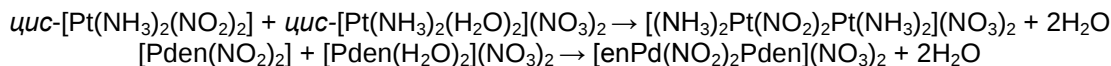
В качестве исходных соединений использовали $K_2[PtCl_4]$ и $K_2[PdCl_4]$. Синтез исходных моноядерных комплексов платины и палладия (ML_2X_2) ($M=Pt, Pd$; $X=Cl, I$; $L=NH_3, \frac{1}{2}en$, где en – этилендиамин), $[Pden(NO_2)_2]$, $[Pden(H_2O)_2](NO_3)_2$, $cis-[Pt(NH_3)_2(NO_2)_2]$, $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2](NO_3)_2$ осуществляли в соответствии с методиками, представленными в работе «Синтез комплексных соединений металлов платиновой группы»¹.

¹Синтез комплексных соединений металлов платиновой группы: справочник / отв. ред. И. И. Черняев. М.: Наука, 1964. 340 с.

Диаквадiamiны получали действием раствора нитрата серебра (I) на соответствующие диацетидиамины ML_2X_2 ($M=Pt, Pd$; $X=Cl, I$; $L=NH_3, \frac{1}{2}en$ – этилендиамин) из расчета 1,98 моль $AgNO_3$ на 1 моль галогенсодержащего соединения, с после-

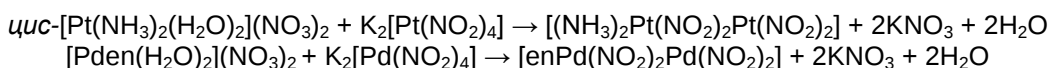
дующим отделением галогенида серебра.

Катионные биядерные комплексы с двумя нитритными мостиками были получены в результате реакции между *цис*-динитродиамином и *цис*-диаквакомплексом:



Комплексы-неэлектролиты синтезировали действием аквакомплексов *цис*-конфигурации на

тетранитрокомплекс:



Синтез $[enPd(NO_2)_2Pden](NO_3)_2$. Навеску 0,23 г $[Pden(NO_2)_2]$ растворяли в 30 см³ воды при нагревании на водяной бане. К полученному раствору приливали раствор $[Pden(H_2O)_2](NO_3)_2$ из расчета 1 моль $[Pden(H_2O)_2](NO_3)_2$ на 1 моль $[Pden(NO_2)_2]$. Раствор перемешивали в течение 30 мин при нагревании на водяной бане, затем охлаждали, профильтровывали, полученный фильтрат упаривали при комнатной температуре до 5–10 см³. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывали, промывали водой, этанолом, сушили до постоянной массы при температуре 80 °С. Цвет полученного продукта – светло-желтый, выход – 65%, $M = 546 \pm 17$ г/моль, $\mu = 251$ См·см²·моль⁻¹. Для $Pd_2C_4H_{16}N_8O_{10}$ вычислено, %: Pd – 38,78; NO₂ – 16,76; найдено, %: Pd – 38,62; NO₂ – 16,48.

Синтез $[enPd(NO_2)_2Pd(NO_2)_2]$. В 35 см³ водного раствора, содержащего 0,326 г аквакомплекса $[Pden(H_2O)_2](NO_3)_2$ (0,001 моль), вносили 0,368 г $K_2[Pd(NO_2)_4]$ (0,001 моль). Раствор перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Выпавший кристаллический осадок отфильтровывали, промывали водой, этанолом. Цвет кристаллов – светло-желтый, выход – 54%, $\mu = 5$ См·см²·моль⁻¹. Для $Pd_2C_2H_8N_6O_8$ вычислено, %: Pd – 46,58; NO₂ – 40,28; найдено, %: Pd – 46,12; NO₂ – 40,01.

Синтез $[(NH_3)_2Pt(NO_2)_2Pt(NH_3)_2](NO_3)_2$. Навеску 0,65 г *цис*- $[Pt(NH_3)_2(NO_2)_2]$ растворяли в 30 см³ воды при нагревании на водяной бане. К полученному раствору приливали раствор *цис*- $[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2](NO_3)_2$ из расчета 1 моль *цис*- $[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2](NO_3)_2$ на 1 моль *цис*- $[Pt(NH_3)_2(NO_2)_2]$. Раствор выпаривали на водяной бане до начала кристаллизации. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали водой, этанолом. Цвет осадка – желтый, выход – 80%, $M = 670 \pm 22$ г/моль, $\mu = 230$ См·см²·моль⁻¹. Для $Pt_2H_{12}N_8O_{10}$ вычислено, %: Pt – 57,86; NO₂ – 13,65; найдено, %: Pt – 57,42; NO₂ – 13,28.

Синтез $[(NO_2)_2Pt(NO_2)_2Pt(NH_3)_2]$. В 35 см³ водного раствора, содержащего 0,389 г аквакомплекса *цис*- $[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2](NO_3)_2$, вносили 0,457 г $K_2[Pt(NO_2)_4]$. Раствор перемешивали в

течение 30 мин при комнатной температуре. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали водой, этанолом. Цвет кристаллов – светло-желтый, выход – 55%, $\mu = 2$ См·см²·моль⁻¹. Для $Pt_2H_6N_6O_8$ вычислено, %: Pt – 64,15; NO₂ – 30,26; найдено, %: Pt – 63,98; NO₂ – 30,28.

Состав и строение были установлены методами элементного анализа, кондуктометрии, потенциометрии, криоскопии, ИК-спектроскопии, рентгенофазового и рентгенофлуоресцентного анализа.

Содержание нитрит-ионов определяли методом иодометрии после разрушения комплексов. Измерение электрической проводимости полученных биядерных комплексов проводили с целью определения типа ионного распада на иономере-кондуктометре АНИОН-4100(4145) при температуре 25 °С с использованием кондуктометрического первичного преобразователя – четырехэлектродной ячейки погружного типа, постоянная которой равна 1 см⁻¹. Определение молярной массы проводили с помощью осмометра-криоскопа ОСКР-1. При расчетах учитывали диссоциацию комплекса по типу сильного электролита на внешнесферные ионы и комплексный ион, при значении изотонического коэффициента для катионных комплексов, равного трем. Из-за низкой растворимости не удалось определить молярную массу комплексов-неэлектролитов с достаточной точностью.

ИК-спектры записывали на спектрометре Perkin-Elmer и Specord M80 в области частот 200–4000 см⁻¹. Содержание платины и палладия определяли рентгенофлуоресцентным методом на спектрофотометре EDX-7000P (SHIMADZU) в вакууме, оснащенном Rh-анодом и кремниевым дрейфовым детектором; напряжение – 50 кВ, ток – 1 мА. Спектры анализируемых веществ представляют собой энергетические линии характеристического излучения элементов и содержат К- и L-серии линий с наибольшей интенсивностью. Идентификация линий и количественный анализ данных проведен с помощью пакета программ EDXIR-Analysis. Для снижения погрешности определения в программном обеспечении про-

изведена балансировка легких элементов. Проверка метода и соответствия результатов проведены на солях палладия с известным содержанием элементов (паспортные данные) по методу фундаментальных параметров и методу градуировочного графика.

Дифрактограммы образцов платины получены на дифрактометре ДРОН-8 (Россия) с острофокусной медной трубкой в излучении Cu-K α (1,54056 Å); напряжение – 34 кВ, ток – 10 мА. Отбор спектральной линии (монокроматизация) осуществлялся одномерным параболическим зеркалом Гебеля (Германия), обеспечивающим формирование пучка плоскопараллельных лучей шириной около 0,6 мм. Для уменьшения рассеяния на элементах коллиматора были применены щели 1 мм. Гониометр – вертикальный, схема измерений – θ – θ . Сбор интенсивностей осуществлялся линейным стриповым позиционно-чувствительным детектором Mythen 2R 1D (Швейцария); число каналов – 640, линейный размер стрипа – 50 мкм (угловой – 0,0144°). Шаг детектора – 0,5° (по 2θ), время набора импульсов – 8 с. Образцы помещались в кюветы из аморфного оргстекла (ПММА), не дающего дифракционных рефлексов кристаллического типа.

Исследования антибактериальной и противогрибковой активности синтезированных комплексов проведены в отношении *Bacillus subtilis* B4647, *Aspergillus brasiliensis* (niger) F679, *Pseudomonas aeruginosa* B8243, *Escherichia coli*. Стандартные штаммы микроорганизмов для исследования взяты из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский центр» Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИ-генетика, Москва).

Антибактериальные свойства оценивали по способности синтезированных комплексов подавлять жизнедеятельность бактерий методом диффузии в агаре и методом разведения в пробирке.

Тестирование проводили в пробирках путем двукратного разведения жидкой питательной среды в ряду из 8–12 пробирок, содержащей исследуемый комплекс при начальной концентрации комплекса $1 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ (1000 мкМ). Взвеси суточных агаровых культур денситометрически (денситометр Densimat Bio Merieux) доводили до плотности 0,5 по стандарту McFarland, содержащему $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Из полученной микробной взвеси готовили серию последовательных разведений 1:10 до концентрации 10^6 КОЕ/мл. Для получения необходимого окончательного инокулюма ($5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл) в каждую пробирку вносили по 50 мкл исследуемой бактериальной суспензии, содержащей 10^6 КОЕ/мл. В контрольной пробирке находился 1 мл бульона без препарата и 50 мкл культуры для каждого

испытываемого штамма (каждый тест проводили в двух повторностях). За ростом микроорганизмов после инкубирования при 37 °С через 24 ч следили визуально, определяя наличие или отсутствие роста в среде, содержащей различные концентрации исследуемого соединения, и измеряя светорассеяние с использованием спектрофотометра UV 1800 (Shimadzu) при $\lambda = 980$ нм. Минимальную ингибирующую концентрацию определяли как концентрацию наибольшего разведения комплекса, тормозящего рост испытываемой культуры.

Из всех прозрачных пробирок делали высевы на плотную питательную среду (агар Мюллера – Хинтона) для определения жизнеспособности клеток. После инкубации посевов в термостате отмечали наименьшую концентрацию препарата в пробирке, высев из которой не дал роста. Эту концентрацию принимали за минимальную бактерицидную концентрацию.

Антибактериальный скрининг комплексов проведен путем измерения диаметра зоны ингибирования роста бактерий и грибов через 24 ч. Для биоанализов готовили суспензию приблизительно $1,5 \cdot 10^8$ клеток на один куб см в стерильном нормальном физиологическом растворе. Бактериальные изоляты предварительно выращивали в питательном бульоне в течение 24 ч с последующим посевом на агаризованную среду, на поверхность которой помещали диски, обработанные водным раствором комплексов ($c = 1000$ мкмоль/дм³). Затем чашки инкубировали при 37 °С в течение 24 ч, после чего наблюдали зоны ингибирования. Эксперименты повторяли не менее трех-пяти раз для каждого организма, данные представлены как среднее значение $\pm$ достоверный интервал.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные моно- и биядерные комплексы палладия представляют собой порошки от белого до желтого цвета, растворимые в воде и в диметилформамиде. Результаты химического анализа показали стехиометрическое соотношение металл:нитрогруппа 1:1 и 1:2 для катионных биядерных и неэлектролитных биядерных комплексов соответственно.

Способ координации нитрогрупп был подтвержден методом ИК-спектроскопии, достаточно широко используемым с этой целью.

В ИК-спектре мономерного комплекса [PdEn(NO₂)₂] наблюдаются полосы с пиками при 1435 и 1385 см⁻¹, характерными для асимметричных и симметричных валентных колебаний нитрогрупп, координированных с палладием [22, 23].

В ИК-спектре биядерного комплекса [enPd(NO₂)₂Pd(NO₂)₂] имеются полосы поглощения с максимумами при 1326 и 1424 см⁻¹, относящиеся соответственно к симметричным и антисимметричным валентным колебаниям концевых

вой нитрогруппы, координированной атомом азота, и полосы поглощения с максимумами при 1174 и 1484 см^{-1} , относящиеся к валентным колебаниям мостиковых NO_2 -групп, координированных атомами азота и кислорода. В то же время в спектре комплекса $[\text{enPd}(\text{NO}_2)_2\text{Pden}](\text{NO}_3)_2$ наблюдаются полосы поглощения с максимумами при 1185 и 1482 см^{-1} , относящиеся к валентным колебаниям только мостиковых NO_2 -групп, координированных N,O-донорными атомами.

Координация этилендиамина в биядерных комплексах палладия через атомы азота подтверждается наличием полос в области 600–400 см^{-1} , относящихся к валентным колебаниям M–N: для комплекса $[\text{enPd}(\text{NO}_2)_2\text{Pd}(\text{NO}_2)_2]$ имеется полоса с максимумом 536 см^{-1} , для катионного комплекса $[\text{enPd}(\text{NO}_2)_2\text{Pden}](\text{NO}_3)_2$ имеются полосы с максимумами 542 и 513 см^{-1} .

В ИК-спектре биядерного комплекса платины $[(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]$ имеются полосы поглощения с максимумами при 1306 и 1394 см^{-1} , относящиеся соответственно к симметричным и антисимметричным валентным колебаниям концевой нитрогруппы, координированной атомом азота, и полосы поглощения с максимумами при 1074 и 1484 см^{-1} , относящиеся к валентным колебаниям мостиковых NO_2 -групп, координированных атомами азота и кислорода (рис. 1). В то же время в спектре комплекса $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NH}_3)_2](\text{NO}_3)_2$ наблюдаются полосы поглощения с максимумами при 1085 и 1491 см^{-1} , относящиеся к валентным колебаниям только мостиковых NO_2 -групп, координированных N,O-донорными атомами (рис. 2).

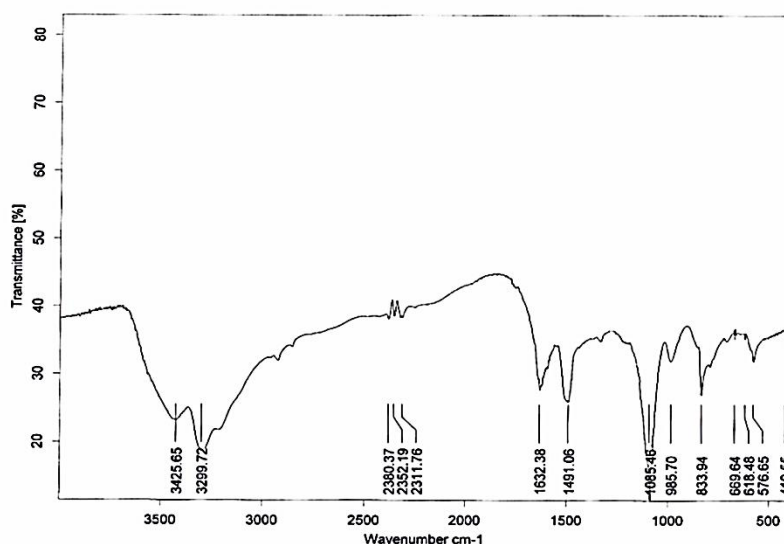


Рис. 1. ИК-спектр поглощения комплекса $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2]$

Fig. 1. IR absorption spectra of complex $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2]$

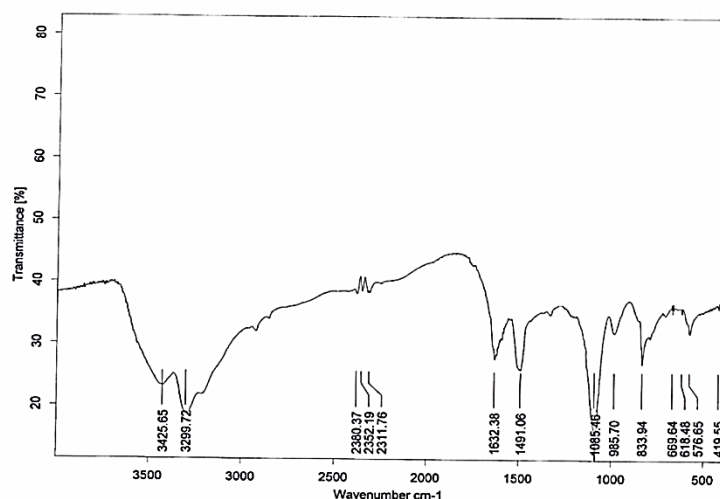


Рис. 2. ИК-спектр поглощения комплекса $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NH}_3)_2](\text{NO}_3)_2$

Fig. 2. IR absorption spectra of complex $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NH}_3)_2](\text{NO}_3)_2$

Полосы поглощения с максимумами при 3287 и 3211 см^{-1} в ИК-спектре биядерного комплекса-неэлектролита $[(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]$ относятся соответственно к антисимметричным и симметричным валентным колебаниям NH аммиака, и полоса поглощения с максимумом при 576 см^{-1} – к валентным колебаниям связи Pt–N. В ИК-спектре комплекса $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NH}_3)_2](\text{NO}_3)_2$ значения частот для аммиачного лиганда составляют, см^{-1} : $\nu_{\text{as}}(\text{NH}) = 3425$, $\nu_{\text{s}}(\text{NH}) = 3299$, $\nu_{\text{s}}(\text{PtN}) = 576$.

Рентгенофазовый анализ показал, что для биядерных комплексов кристаллические фазы исходных моноядерных комплексов не проявляются. Это указывает на образование новых продуктов. На рис. 3 приведены дифрактограммы димерного комплекса платины катионного типа $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NH}_3)_2](\text{NO}_3)_2$ и мономерного комплекса платины, взятого в качестве исходного при синтезе.

По результатам антибактериального скрининга комплексов (рис. 4) отмечено, что ком-

плексы проявляют различную степень ингибирующего воздействия на рост тестируемых видов бактерий и грибов: их антимикробная активность по отношению к испытуемым тест-культурам зависит от состава и строения внутренней сферы координационного центра, природы центрального атома, числа координационных центров, их заряда.

По сравнению с биядерными моноядерные комплексы платины (II) и палладия (II) проявляют низкую антибактериальную активность. Для комплексов платины и палладия характерно резкое различие. Так, катионный биядерный комплекс Pt, содержащий только мостиковые нитритные лиганды (см. рис. 4, поз. 6), проявляет больший эффект ингибирования роста микроорганизмов *Bacillus subtilis* B4647, *Pseudomonas aeruginosa* B8243, *Escherichia coli* и грибов *Aspergillus brasiliensis* F679 по сравнению с комплексом-неэлектролитом Pt (см. рис. 4, поз. 5), содержащим и концевые, и мостиковые NO_2 -лиганды.

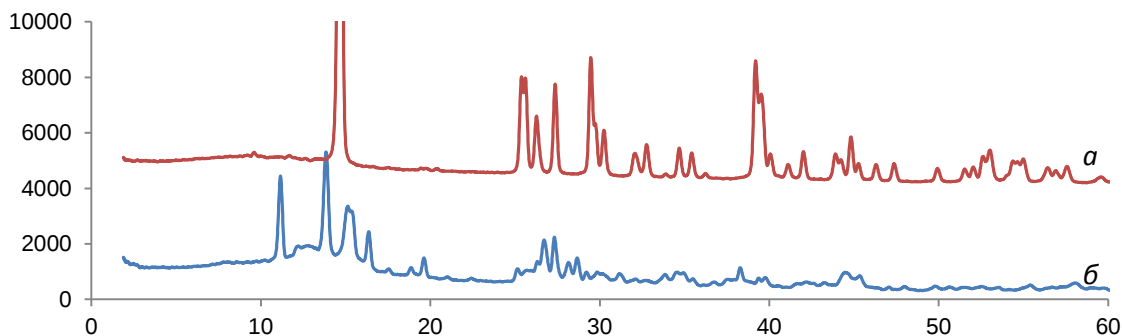


Рис. 3. Дифрактограммы моноядерного комплекса $\text{Pt}(\text{NH}_3 \text{ NO}_2)_2$ (а) и димерного комплекса $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NH}_3)_2](\text{NO}_3)_2$ (б)

Fig. 3. Diffractograms of mononuclear complex $\text{Pt}(\text{NH}_3 \text{ NO}_2)_2$ (a) and of binuclear complexes $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NH}_3)_2](\text{NO}_3)_2$ (b)

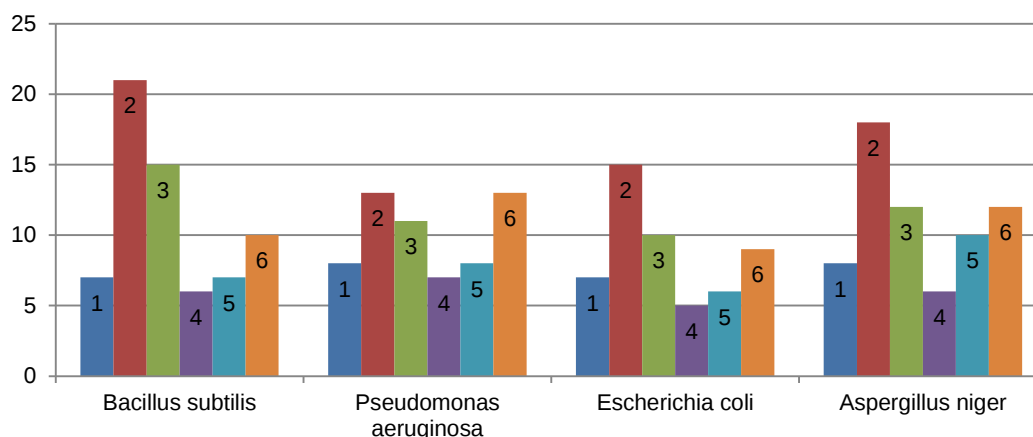


Рис. 4. Диаметр, мм, зон ингибирования роста бактерий и грибов под действием комплексов:

1 – $\text{Pden}(\text{NO}_2)_2$; 2 – $[\text{enPd}(\text{NO}_2)_2\text{Pd}(\text{NO}_2)_2]$; 3 – $[\text{enPd}(\text{NO}_2)_2\text{Pden}](\text{NO}_3)_2$;
4 – $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{NO}_2)_2$; 5 – $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2]$; 6 – $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NH}_3)_2](\text{NO}_3)_2$

Fig. 4. Diameter (mm) of the growth inhibition zone of the Bacteria and fungi under the influence of complexes:

1 – $\text{Pden}(\text{NO}_2)_2$; 2 – $[\text{enPd}(\text{NO}_2)_2\text{Pd}(\text{NO}_2)_2]$; 3 – $[\text{enPd}(\text{NO}_2)_2\text{Pden}](\text{NO}_3)_2$;
4 – $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{NO}_2)_2$; 5 – $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2]$; 6 – $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{NO}_2)_2\text{Pt}(\text{NH}_3)_2](\text{NO}_3)_2$

В отношении грамотрицательных бактерий *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* наибольшую антимикробную активность показали димерный комплекс палладия неэлектролитного типа (см. рис. 4, поз. 2) и димерный комплекс платины катионного типа (см. рис. 4, поз. 6).

Результаты исследования антибактериальной активности достоверно показали, что активность комплекса-неэлектролита палладия более выражена в отношении бактерий *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* и грибов *Aspergillus niger* (см. рис. 4, поз. 2). Исключение составила *Pseudomonas aeruginosa*, в отношении которой активность комплекса-неэлектролита палладия сопоставима с активностью катионного биядерного комплекса платины (см. рис. 4, поз. 6). Таким образом, большая лабильность комплекса благоприятствует проявлению антибактериальных свойств.

Полученные данные подтверждают результаты ряда работ по исследованию комплексов Pd. Авторами работы [24] исследованы антибактериальные свойства моно- и биядерных комплексов палладия с 5-метил-5-(3-пиридил)-2,4-имидазолидендионлигандом (L). В двухъядерном комплексе $[Pd_2Cl_4L_2]$ каждый атом палладия координируется одним атомом азота лиганда L и тремя атомами хлора (один в качестве концевой и два в качестве мостиковых лигандов). Более высокую активность против *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens* и *Bacillus cereus* проявил двухъядерный комплекс палладия (II) по сравнению с исходным органическим лигандом и моноядерным комплексом $[PdCl_2L_2]$.

Известен механизм действия препаратов Pt(II) – аналогов цисплатина, заключающийся в замещении хлоридного или аммонийного лиганда [25] с последующим ковалентным связыванием Pt(II) с азотами N7 пуриновых оснований ДНК и образованием сшивок между цепочками [25, 26]. Авторами этих и других работ экспериментально доказано: чем легче диссоциирует

комплекс, тем в большей степени он способен повреждать ДНК.

Авторами работы [13] было показано, что связывание с ДНК пиримидинового биядерного комплекса платины, содержащего нитрогруппу, происходит через частичный интеркаляционный режим. Комплекс проявляет самое высокое сродство к связыванию по сравнению с другими комплексами и лигандами за счет существования нитрогруппы. «В электростатическом и канавочном связывании вязкость раствора ДНК остается неизменной, в то время как в классическом интеркалятивном связывании вязкость будет возрастать. Среди этих взаимодействий интеркалирование и связывание канавок являются наиболее важными режимами связывания ДНК, поскольку они неизменно приводят к деградации клеток».

Данные исследования полиядерных комплексов с полиаминами подтвердили более высокую активность многоядерных комплексов по сравнению с мономерными аналогами; присутствие более чем одного металлического центра в многоядерных комплексах позволяет им более эффективно связываться с ДНК [27].

Значения минимальной ингибирующей и минимальной бактерицидной концентраций исследуемых комплексов, при которых наблюдается подавление видимого роста испытываемых микроорганизмов и грибов и бактерицидный эффект действия комплексов, варьируются в диапазоне 62,5–125 мкмоль/дм³ (таблица).

Однако необходимо учитывать, что несмотря на широкий диапазон антимикробной активности растворов комплексов минимальная действующая концентрация для бактерий и грибов отличается. Это объясняется разницей в строении клеточных стенок, различиями протекающих метаболических процессов, пространственной организацией колоний [3]. В свою очередь грамотрицательные бактерии высокоустойчивы к неблагоприятным условиям благодаря наличию дополнительной внешней мембраны.

Значения минимальной ингибирующей концентрации и минимальной бактерицидной концентрации комплекса палладия $[enPd(NO_2)_2Pd(NO_2)_2]$

Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration values of the palladium complexes $[enPd(NO_2)_2Pd(NO_2)_2]$

Микроорганизмы и грибы	Минимальная ингибирующая концентрация / минимальная бактерицидная концентрация, мкмоль/дм ³						
	500–250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9
<i>Bacillus subtilis</i> B4647	- / -	- / -	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (niger) F679	- / -	- / -	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B8243	- / -	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
<i>Escherichia coli</i>	- / -	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +

«-» – подавление роста микроорганизмов и грибов; «+» – рост микроорганизмов и грибов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы биядерные комплексы платины и палладия, содержащие мостиковые и концевые нитритные лиганды. Скрининг антибактериальных и противогрибковых свойств исследуемых комплексов показал высокую актив-

ность биядерного комплекса палладия (II) неэлектролитного типа и биядерного комплекса платины (II) катионного типа. Высокая лабильность комплексов способствует сильному химическому взаимодействию комплексов с ДНК антибактериальных клеток. Увеличение числа координа-

ционных центров приводит к повышению антимикробной активности. Изменяя структуру комплекса, состав и заряд внутренней сферы, число координационных центров, природу и дентат-

ность лигандов, можно достичь более высокого токсического эффекта комплексов в отношении бактерий и грибов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Salishcheva O. V., Prosekov A. Yu. Antimicrobial activity of mono- and polynuclear platinum and palladium complexes // *Foods and Raw Materials*. 2020. Vol. 8, no. 2. P. 298–311. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-2-298-311>.
2. Солодухина О. А., Верлан Н. В., Кочкина Е. О., Рожкова Н. Ю. Данные мониторинга безопасности антибактериальных препаратов в клинической практике // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2018. Т. 8. N 2. С. 117–124. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-2-117-124>.
3. Фролова Ю. В., Кириш И. А., Безнаева О. В., Помохова Д. А., Тихомиров А. А. Создание упаковочных полимерных материалов с антимикробными свойствами // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2017. Т. 7, N 3. С. 145–152. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-3-145-152>.
4. Прозорова Г. Ф., Поздняков А. С., Иванова А. А., Емельянов А. И., Фадеева Т. В., Ермакова Т. Г. Биологическая активность полимерного серебросодержащего нанокompозита // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2018. Т. 8, N 2. С. 63–68. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-2-63-68>.
5. Прозорова Г. Ф., Коржова С. А., Мазяр И. В., Беловежец Л. А., Кузнецова Н. П., Емельянов А. И. [и др.]. Синтез и свойства новых сополимер-Ag(0) нанокompозитов // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019. Т. 9, N 1. С. 22–27. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-22-27>.
6. Fanelli M., Formica M., Fusi V., Giorgi L., Micheloni M., Paoli P. New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents // *Coordination Chemistry Reviews*. 2016. Vol. 310. P. 41–79. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.11.004>.
7. Sabounchei S. J., Shahriary P., Gholiee Y., Salehzadeh S., Khavasi H. R., Chehregani A. Platinum and palladium complexes with 5-methyl-5-(2-pyridyl)-2,4-imidazolidinedione: Synthesis, crystal and molecular structure, theoretical study, and pharmacological investigation // *Inorganica Chimica Acta*. 2014. Vol. 409(B). P. 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2013.09.051>.
8. Stojković D. L., Jevtić V. V., Vuković N., Vukić M., Čanović P., Zarić M. M., et al. Synthesis, characterization, antimicrobial and antitumor reactivity of new palladium (II) complexes with methionine and tryptophane coumarine derivatives // *Journal of Molecular Structure*. 2018. Vol. 1157. P. 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.12.095>.
9. Rani S., Kumar S., Chandra S. Spectroscopic and biological approach in the characterization of a novel 14-membered [N4] macrocyclic ligand and its Palladium (II), Platinum (II), Ruthenium (III) and Iridium (III) complexes // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014. Vol. 118. P. 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.08.079>.
10. Zhang X., Liu D., Lv F., Yu B., Shen Y., Cong H. Recent advances in ruthenium and platinum based supramolecular coordination complexes for antitumor therapy // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019. Vol. 182. P. 110373. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110373>.
11. Bakalova A. G., Buyukliev R. T., Nikolaeva R. P., Shivachev B. L., Mihaylova R. A., Konstantinov S. M. Synthesis, Spectroscopic properties, crystal structure and biological evaluation of new platinum complexes with 5-methyl-5-(2-thiomethyl)ethyl hydantoin // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 19, no. 10. P. 1243–1252. <https://doi.org/10.2174/1871520619666190214103345>.
12. Radić G. P., Glodović V. V., Ratković Z. R., Garcia-Granda S., Rocas F. L., Menéndez T. L., et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel platinum (IV) and palladium (II) complexes with meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoic acid – Crystal structure of H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O // *Journal of Molecular Structure*. 2012. Vol. 1029. P. 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.07.007>.
13. Lunagariya M. V., Thakor K. P., Waghele B. N., Pathak C., Patel M. N. Design, synthesis, pharmacological evaluation and DNA interaction studies of binuclear Pt(II) complexes with pyrazolo[1,5-a]pyrimidine scaffold // *Applied Organometallic Chemistry*. 2018. Vol. 32, no. 4. P. e4222. <https://doi.org/10.1002/aoc.4222>.
14. Corduneanu O., Paquim A. M. C., Diclescu V., Fiuza S., Marques M. P. M., Oliveira-Brett A. M. DNA Interaction with Palladium Chelates of Biogenic Polyamines Using Atomic Force Microscopy and Voltammetric Characterization // *Analytical Chemistry*. 2010. Vol. 82, no. 4. P. 1245–1252. <https://doi.org/10.1021/ac902127d>.
15. Juribašić M., Molčanov K., Kojić-Prodić B., Bellotto L., Kralj M., Zani F., et al. Palladium (II) complexes of quinolinylaminophosphonates: Synthesis, structural characterization, antitumor and antimicrobial activity // *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2011. Vol. 105, no. 6. P. 867–879. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.03.011>.
16. Potočník I., Drweesh S. A., Farkasová V., Lüköová A., Sabolová D., Radojević I. D., et al. Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part IX: Synthesis, structures, spectra, in vitro antimicrobial and anti-tumor activities and DNA

binding of Pd (II) complexes with 7-bromo-quinolin-8-ol // *Polyhedron*. 2017. Vol. 135. P. 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.07.008>.

17. Naglah A. M., Al-Omar M. A., Almezizia A. A., AlKahtani H. M., Bhat M. A., Al-Shaklah N. S., et al. Synthesis, thermogravimetric, and spectroscopic characterizations of three palladium metal (II) ofloxacin drug and amino acids mixed ligand complexes as advanced antimicrobial materials // *Journal of Molecular Structure*. 2021. Vol. 1225, no. 4. Article no. 129102. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129102>.

18. Rubino S., Pibiri I., Minacori Ch., Alduina R., Di Stefano V., Orecchio S., et al. Synthesis, structural characterization, antiproliferative and antimicrobial activity of binuclear and mononuclear Pt (II) complexes with perfluoroalkyl-heterocyclic ligands // *Inorganica Chimica Acta*. 2018. Vol. 483. P. 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.07.039>.

19. Rubino S., Busà R., Attanzio A., Alduina R., Di Stefano V., Girasolo M. A., et al. Synthesis, properties, antitumor and antibacterial activity of new Pt (II) and Pd (II) complexes with 2,2'-dithiobis(benzothiazole) ligand // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2017. Vol. 25, no. 8. P. 2378–2386. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.067>.

20. Littlefield Sh. L., Baird M. C., Anagnostopoulou A., Raptis L. Synthesis, characterization and Stat3 inhibitory properties of the prototypical platinum (IV) anticancer drug, [PtCl₃(NO₂)(NH₃)₂] (CPA-7) // *Inorganic Chemistry*. 2008. Vol. 47, no. 7. P. 2798–2804. <https://doi.org/10.1021/ic702057q>.

21. Gel'fman M. I., Salishcheva O. V., Moldagulova N. E. Synthesis and kinetic studies of non-electrolytic binuclear platinum and palladium bromide complexes // *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. 2005. Vol. 50, no. 7. P. 999–1003.

22. Khranenko S. P., Kuratieva N. V., Plyusnin P. E., Gromilov S. A. Two crystal modifications of [Pden(NO₂)₂]. Synthesis, structure, and thermal properties // *Journal of Structural Chemistry*. 2014. Vol. 55, no. 2. P. 299–305. <https://doi.org/10.1134/S0022476614020164>.

23. Накамото К. ИК-спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений / пер с англ. Л. В. Христенко; под ред. Ю. А. Пентина. М.: Мир, 1991. 536 с.

24. Sabounchei S. J., Shahriary P., Salehzadeh S., Gholiee Y., Chehregani A. Spectroscopic, theoretical, and antibacterial approach in the characterization of 5-methyl-5-(3-pyridyl)-2,4-imidazolidenedione ligand and of its platinum and palladium complexes // *Comptes Rendus Chimie*. 2015. Vol. 18, no. 5. P. 564–572. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2014.04.013>.

25. Hubbard R. D., Fidanze S. Alkylating and platinum antitumor compounds // *Comprehensive Medicinal Chemistry*. 2006. Vol. 7. P. 129–148. <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00207-8>.

26. Poklar N., Pilch D. S., Lippard S. J., Redding E. A., Dunham S. U., Breslauer K. J. Influence of cisplatin intrastrand crosslinking on the conformation, thermal stability, and energetics of a 20-mer DNA duplex // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1996. Vol. 93, no. 15. P. 7606–7615. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7606>.

27. Corduneanu O., Chiorcea-Paquim A.-M., Fiuza S. M., Marques M. P. M., Oliveira-Brett A. M. Polynuclear palladium complexes with biogenic polyamines: AFM and Voltammetric Characterization // *Bioelectrochemistry*. 2010. Vol. 78, no. 2. P. 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.08.003>.

REFERENCES

1. Salishcheva O. V., Prosekov A. Yu. Antimicrobial activity of mono- and polynuclear platinum and palladium complexes. *Foods and Raw Materials*. 2020;8(2):298–311. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-2-298-311>.

2. Solodukhina O. A., Verlan N. V., Kochkina E. O., Rozhkova N. U. Данные мониторинга безопасности антибактериальных препаратов в клинической практике. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018;8(2):117–124. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-2-117-124>.

3. Frolova Y. V., Kirsh I. A., Beznaeva O. V., Pomogova D. A., Tikhomirov A. A. Creation of polymeric packaging materials with antimicrobial properties. *Izvestia Vuzov. Prikladnaya Khimia i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017;7(3):145–152. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-3-145-15>.

4. Prozorova G. F., Pozdnyakov A. S., Ivano-

va A. A., Emel'yanov A. I., Fadeeva T. V., Ermakova T. G. The biological activity of polymer silver-containing nanocomposites. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018;8(2):63–68. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-2-63-68>.

5. Prozorova G. F., Korzhova S. A., Mazyar I. V., Belovezhets L. A., Kuznetsova N. P., Emel'yanov A. I., et al. Synthesis and properties of novel copolymer-Ag(0) nanocomposites. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018;9(1):22–27. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-1-22-27>.

6. Fanelli M., Formica M., Fusi V., Giorgi L., Micheloni M., Paoli P. New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents. *Coordination Chemistry Reviews*. 2016;310:41–79. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.11.004>.

7. Sabounchei S. J., Shahriary P., Gholiee Y., Salehzadeh S., Khavasi H. R., Chehregani A. Plati-

num and palladium complexes with 5-methyl-5-(2-pyridyl)-2,4-imidazolidinedione: Synthesis, crystal and molecular structure, theoretical study, and pharmacological investigation. *Inorganica Chimica Acta*. 2014;409(B):265–275. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2013.09.051>.

8. Stojković D. L., Jevtić V. V., Vuković N., Vukić M., Čanović P., Zarić M.M., et al. Synthesis, characterization, antimicrobial and antitumor reactivity of new palladium (II) complexes with methionine and tryptophane coumarine derivatives. *Journal of Molecular Structure*. 2018;1157:425–433. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.12.095>.

9. Rani S., Kumar S., Chandra S. Spectroscopic and biological approach in the characterization of a novel 14-membered [N₄] macrocyclic ligand and its Palladium (II), Platinum (II), Ruthenium (III) and Iridium (III) complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014;118:244–250. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.08.079>.

10. Zhang X., Liu D., Lv F., Yu B., Shen Y., Cong H. Recent advances in ruthenium and platinum based supramolecular coordination complexes for antitumor therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;182:110373. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110373>.

11. Bakalova A. G., Buyukliev R. T., Nikolova R. P., Shivachev B. L., Mihaylova R. A., Konstantinov S. M. Synthesis, Spectroscopic properties, crystal structure and biological evaluation of new platinum complexes with 5-methyl-5-(2-thiomethyl)ethyl hydantoin. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2019;19(10):1243–1252. <https://doi.org/10.2174/1871520619666190214103345>.

12. Radić G. P., Glodović V. V., Ratković Z. R., Garcia-Granda S., Rocas F. L., Menéndez T. L., et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel platinum (IV) and palladium (II) complexes with meso-1,2-diphenyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoic acid – Crystal structure of H₂-1,2-dpheddp·2HCl·H₂O. *Journal of Molecular Structure*. 2012;1029:180–186. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.07.007>.

13. Lunagariya M. V., Thakor K. P., Waghela B. N., Pathak C., Patel M. N. Design, synthesis, pharmacological evaluation and DNA interaction studies of binuclear Pt(II) complexes with pyrazolo[1,5-a]pyrimidine scaffold. *Applied Organometallic Chemistry*. 2018;32(4):e4222. <https://doi.org/10.1002/aoc.4222>.

14. Corduneanu O., Paquim A. M. C., Diculescu V., Fiuza S., Marques M. P. M., Oliveira-Brett A. M. DNA Interaction with Palladium Chelates of Biogenic Polyamines Using Atomic Force Microscopy and Voltammetric Characterization. *Analytical Chemistry*. 2010;82(4):1245–1252. <https://doi.org/10.1021/ac902127d>.

15. Juribašić M., Molčanov K., Kojić-Prodić B., Bellotto L., Kralj M., Zani F., et al. Palladium (II) complexes of quinolinylaminophosphonates: Synthesis, structural characterization, antitumor and antimicrobial activity. *Journal of Inorganic Bio-*

chemistry. 2011;105(6):867–879. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.03.011>.

16. Potočník I., Drweesh S. A., Farkasová V., Lüköová A., Sabolová D., Radojević I. D., et al. Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part IX: Synthesis, structures, spectra, in vitro antimicrobial and anti-tumor activities and DNA binding of Pd (II) complexes with 7-bromo-quinolin-8-ol. *Polyhedron*. 2017;135:195–205. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.07.008>.

17. Naglah A. M., Al-Omar M. A., Almhizia A. A., AlKahtani H. M., Bhat M. A., Al-Shakliah N. S., et al. Synthesis, thermogravimetric, and spectroscopic characterizations of three palladium metal (II) ofloxacin drug and amino acids mixed ligand complexes as advanced antimicrobial materials. *Journal of Molecular Structure*. 2021;1225(4). Article no. 129102. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129102>.

18. Rubino S., Pibiri I., Minacori Ch., Alduina R., Di Stefano V., Orecchio S., et al. Synthesis, structural characterization, antiproliferative and antimicrobial activity of binuclear and mononuclear Pt (II) complexes with perfluoroalkyl-heterocyclic ligands. *Inorganica Chimica Acta*. 2018;483:180–190. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.07.039>.

19. Rubino S., Busà R., Attanzio A., Alduina R., Di Stefano V., Girasolo M. A., et al. Synthesis, properties, antitumor and antibacterial activity of new Pt (II) and Pd (II) complexes with 2,2'-dithio-bis(benzothiazole) ligand. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2017;25(8):2378–2386. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.067>.

20. Littlefield Sh. L., Baird M. C., Anagnostopoulou A., Raptis L. Synthesis, characterization and Stat3 inhibitory properties of the prototypical platinum (IV) anticancer drug, [PtCl₃(NO₂)(NH₃)₂] (CPA-7). *Inorganic Chemistry*. 2008;47(7):2798–2804. <https://doi.org/10.1021/ic702057q>.

21. Gel'fman M. I., Salishcheva O. V., Moldagulova N. E. Synthesis and kinetic studies of nonelectrolytic binuclear platinum and palladium bromide complexes. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. 2005;50(7):999–1003.

22. Khranenko S. P., Kuratieva N. V., Plyusnin P. E., Gromilov S. A. Two crystal modifications of [Pden(NO₂)₂]. Synthesis, structure, and thermal properties. *Journal of Structural Chemistry*. 2014;55(2):299–305. <https://doi.org/10.1134/S0022476614020164>.

23. Nakamoto K. *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds*. 4th ed. New York: John Wiley and sons. (Russ. ed.: Nakamoto K. *ИК-спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений*. Moscow: Mir, 1991. 536 p.)

24. Sabounchei S. J., Shahriary P., Salehzadeh S., Gholiee Y., Chehregani A. Spectroscopic, theoretical, and antibacterial approach in the characterization of 5-methyl-5-(3-pyridyl)-2,4-imidazolidinedione ligand and of its platinum and palladium complexes. *Comptes Rendus Chimie*. 2015;18(5):564–572.

<https://doi.org/10.1016/j.crci.2014.04.013>.

25. Hubbard R. D., Fidanze S. Alkylating and platinum antitumor compounds. *Comprehensive Medicinal Chemistry*. 2006;7:129–148. <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00207-8>.

26. Poklar N., Pilch D. S., Lippard S. J., Redding E. A., Dunham S. U., Breslauer K. J. Influence of cisplatin intrastrand crosslinking on the conformation, thermal stability, and energetics of a 20-mer

DNA duplex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1996;93(15):7606–7615. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7606>.

27. Corduneanu O., Chiorcea-Paquim A.-M., Fiuza S. M., Marques M. P. M., Oliveira-Brett A. M. Polynuclear palladium complexes with biogenic polyamines: AFM and Voltammetric Characterization. *Bioelectrochemistry*. 2010;78(2):97–105. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.08.003>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

О. В. Салищева,

к.х.н., доцент,
Кемеровский государственный университет,
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,
Российская Федерация,
salishchevaov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1885-2060>

А. Ю. Просеков,

д.т.н., член-корреспондент РАН,
ректор,
Кемеровский государственный университет,
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,
Российская Федерация,
rector@kemsu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5630-3196>

Н. Е. Молдагулова,

к.х.н., доцент,
Кемеровский государственный университет,
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,
Российская Федерация,
olimpkemtipp@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9874-5355>

В. М. Пугачев,

к.х.н., доцент,
Кемеровский государственный университет,
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,
Российская Федерация,
vm1707@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7226-4732>

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.

*Поступила в редакцию 20.08.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olesya V. Salishcheva,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Kemerovo State University,
6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
salishchevaov@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1885-2060>

Alexander Yu. Prosekov,

Dr. Sci. (Engineering), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Rector,
Kemerovo State University,
6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
rector@kemsu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5630-3196>

Natalya E. Moldagulova,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Kemerovo State University,
6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
olimpkemtipp@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9874-5355>

Valery M. Pugachev,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Kemerovo State University,
6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
vm1707@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7226-4732>

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 20.08.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.*

Научная статья

УДК 542.61 : 66.022.51 : 66.011

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-663-672>



Влияние механохимической активации на растворение трилоном Б модельных отложений продуктов коррозии, образованных на ионообменных смолах

Марина Сергеевна Паламарчук, Дарья Хамитовна Шлык,
Светлана Юрьевна Братская

Институт химии ДВО РАН, г. Владивосток, Российская федерация

Автор, ответственный за переписку: Паламарчук Марина Сергеевна, marina_p@ich.dvo.ru

Аннотация. При химической дезактивации отработанных ионообменных смол фильтров спецдоочистки атомных электростанций возникает проблема удаления из них радионуклидов, входящих в состав неорганических отложений, образованных в процессе эксплуатации и промежуточного хранения. Как правило, в таких отложениях радионуклиды коррозионной группы ($^{58,60}\text{Co}$, ^{54}Mn , ^{51}Cr) зафиксированы в кристаллической решетке труднорастворимых оксидов железа. Цель работы – исследование возможности применения механохимической активации при дезактивации отработанных ионообменных смол, загрязненных отложениями активированных продуктов коррозии конструкционных материалов. В качестве модельных отложений использован образец природного магнетита и магнетит, синтезированный на поверхности катионита КУ-2-8 в присутствии метки ^{57}Co . Показано, что увеличение времени механохимической активации приводит к увеличению скорости растворения магнетита в модельных дезактивирующих растворах на основе динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (трилон Б) и азотной кислоты. Показано, что при использовании трилона Б магнетит растворяется более эффективно, что объясняется особенностями взаимодействия поверхности оксида с органическими комплексообразующими агентами. Предположено, что при механохимической активации магнетита в присутствии сухих реагентов (трилона Б, щавелевой, аскорбиновой и лимонной кислот) протекают твердофазные реакции, приводящие к образованию на поверхности оксида труднорастворимой оболочки, что затрудняет растворение при невысоких соотношениях магнетит/раствор. Для магнетита, активированного в присутствии щавелевой кислоты, показано, что увеличение отношения раствор/магнетит способствует растворению оксидов железа по сравнению с безреагентной активацией. На примере модельного катионита показано, что скорость и эффективность дезактивации отработанных ионообменных смол, загрязненных отложениями активированных продуктов коррозии, существенно возрастает после механохимической активации в присутствии щавелевой кислоты.

Ключевые слова: отработанные ионообменные смолы, радионуклиды кобальта, продукты коррозии, оксиды железа, дезактивация

Благодарности. Рентгенофазовый анализ и определение содержания железа методом атомно-абсорбционной спектроскопии выполнены на оборудовании ЦКП «Дальневосточный центр структурных исследований» (Институт химии ДВО РАН, Владивосток, Россия).

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 18-73-10066, <https://rscf.ru/project/18-73-10066/>).

Для цитирования: Паламарчук М. С., Шлык Д. Х., Братская С. Ю. Влияние механохимической активации на растворение трилоном Б модельных отложений продуктов коррозии, образованных на ионообменных смолах // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 663–672. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-663-672>.

Influence of mechanochemical activation on dissolving model corrosion films formed on ion-exchange resins using Trilon B

Marina S. Palamarchuk, Darya Kh. Shlyk,
Svetlana Yu. Bratskaya

Institute of Chemistry FEB RAS, Vladivostok, Russian Federation

Corresponding author: Marina S. Palamarchuk, marina_p@ich.dvo.ru

Abstract. Inorganic deposits formed during operation and intermediate storage contain radionuclides, whose removal during the chemical decontamination of spent ion-exchange resins used in filters for special water purification at nuclear power plants has proved to be a challenge. In such deposits, radionuclides of the corrosion group ($^{58,60}\text{Co}$, ^{54}Mn , ^{51}Cr) are typically located in the crystal lattice of poorly soluble iron oxides. The present work discusses the possibility of using mechanochemical activation in the decontamination of spent ion-exchange resins polluted with deposits of activated corrosion products from structural materials. Samples of natural and synthesised on the surface of the KU-2-8 cation exchanger in the presence of the ^{57}Co label magnetites were used as model deposits. It was shown that an increase in the duration of mechanochemical activation leads to an increase in the dissolution rate of magnetite in model decontamination solutions based on ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Trilon B) and nitric acid. It was shown that, when using Trilon B, magnetite dissolves more efficiently, which is explained by the interaction between the oxide surface and organic complexing agents. It can be assumed that solid-phase reactions occur during the mechanochemical activation of magnetite in the presence of dry reagents (Trilon B, oxalic, ascorbic and citric acids). Therefore, a poorly soluble shell formed on the oxide surface hinders the dissolution at a low magnetite/solution ratio. Unlike the reagent-free activation, for magnetite activated in the presence of oxalic acid, an increase in the solution/magnetite ratio promotes the dissolution of iron oxides. Using the example of a model cation exchanger, it was shown that the rate and efficiency of decontamination of spent ion-exchange resins polluted with deposits containing activated corrosion products increase significantly after mechanochemical activation in the presence of oxalic acid.

Keywords: spent ion-exchange resins, cobalt radionuclides, corrosion products, iron oxides, decontamination

Acknowledgements. XRD investigations and atomic absorption analysis were conducted using equipment of Far East Center of Structural Studies (Institute of Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia).

Funding. The study was financially supported by the Russian Science Foundation (project 18-73-10066P, <https://rscf.ru/project/18-73-10066/>).

For citation: Palamarchuk M. S., Shlyk D. Kh., Bratskaya S. Yu. Influence of mechanochemical activation on dissolving model corrosion films formed on ion-exchange resins using Trilon B. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):663-672. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-663-672>.

ВВЕДЕНИЕ

Выведенные из эксплуатации отработанные ионообменные смолы (ОИОС) из фильтров спецводоочистки относятся к радиоактивным отходам и нуждаются в кондиционировании, то есть мероприятиях, направленных на иммобилизацию радионуклидов при долговременном хранении (захоронении) [1]. В настоящее время предложен ряд методов кондиционирования ОИОС от прямого отверждения с включением в неорганические и органические компаунды (цемент, битум, пластмассы) [2, 3] до переработки с полной деструкцией органической матрицы смол (сжигание, пиролиз, жидкофазное окисление) [4–6]. Весьма перспективным является подход, включающий глубокую дезактивацию смол, то есть отмывку органической матрицы ОИОС специ-

ально подобранными растворами с переводом ОИОС в нерадиоактивные отходы [7]. Однако при дезактивации ОИОС возникает проблема удаления из них радионуклидов, входящих в состав неорганических отложений, образованных в процессе эксплуатации и промежуточного хранения смол [8, 9]. Значительную проблему представляет загрязнение смол активированными продуктами коррозии (ПК), вынесенными из активной зоны в виде частиц, в которых радионуклиды коррозионной группы ($^{58,60}\text{Co}$, ^{54}Mn , ^{51}Cr) зафиксированы в кристаллической решетке труднорастворимых оксидов железа [10, 11].

Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) является аминополикарбоксилатным комплексонном, образующим устойчивые комплексы с радионуклидами коррозионной группы и ионами

железа. Так, логарифм константы устойчивости комплексов Со-ЭДТА достигает 16 и 41 для Со(II) и Со(III), а комплексов Fe-ЭДТА – 14 и 25,7 для Fe(II) и Fe(III) соответственно. Благодаря этому ЭДТА и ее соли (главным образом, трилон Б) широко используются в атомной энергетике в составе дезактивирующих растворов для удаления продуктов коррозии с конструкционных материалов и механически загрязненных катионитов.

В последнее время для переработки отходов все чаще предлагаются методы, включающие механохимическую активацию (МХА) [12–16]. В процессе МХА может происходить снижение размера частиц, образование новых поверхностей, точечных дефектов, изменение кристаллической структуры [14, 15]. В настоящей работе исследовано влияние МХА на растворимость модельных железооксидных отложений в модельных дезактивирующих растворах, содержащих трилон Б.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали концентрат природного магнетита и синтетический магнетит, нанесенный на поверхность катионита КУ-2-8. Синтез магнетита на поверхности катионита проводили в присутствии метки ^{57}Co по методике, описанной в работе [9]. Затем катионит перенесли в колонку и обрабатывали раствором 4 М азотной кислоты и раствором, содержащим нитрат натрия и гидроксид натрия (2,25 и 0,75 М соответственно) до удаления всех обменно-связанных с матрицей катионита радионуклидов с установлением постоянной удельной активности, не снижаемой последующими обработками. После отмывки дистиллированной водой катионит обезвоживали в течение 5 ч в сушильном шкафу при 120 °С. Удельная активность полученного катионита составила 154 Бк/г.

МХА образцов оксида и катионита проводили в вертикальной планетарной мельнице (Changsha Tianchuang Powder Technology Co Ltd., КНР) при скорости 800 об./мин, материал стаканов и шаров – карбид вольфрама, диаметр шара – 10 мм, масса шара – 7 г.

Эксперименты по растворению и дезактивации проводили в полипропиленовых емкостях с герметичной крышкой в статических условиях при перемешивании на шейкере. Растворение оксида проводили при соотношении Ж:Т, равном 100, 250, 320 и 500 мл/г (для образцов, полученных после МХА с реагентами, объем раствора относили к исходной массе оксида в смеси с реагентом). Для определения содержания железа в растворе отбирали аликвоты объемом 0,2 мл. Дезактивацию катионита приводили при соотношении раствор/катионит – 50 мл/г. Для определения активности отбирали пипеткой половину объема раствора и измеряли активность раствора (A_p), а также оставшейся смеси катионита и

раствора ($A_{к+р}$). После измерений раствор возвращали в емкость и продолжали эксперимент. Активность катионита, A_k , определяли по формуле

$$A_k = A_{р+к} - A_p. \quad (1)$$

Степень дезактивации катионита рассчитывали по формуле

$$S\% = (1 - (A_k / A_0)) \times 100, \quad (2)$$

где A_k – активность образца, Бк; A_0 – исходная активность образца, Бк.

Перед отбором проб для анализа проводили центрифугирование при скорости 2000 об./мин в течение 2 мин с использованием центрифуги MT-45 (Hangzhou MIU Instruments Co Ltd., КНР). Содержание железа в растворах определяли атомно-абсорбционным методом на спектрометре Solaar M6 (Thermo Scientific, США). Активность радионуклидов ^{57}Co определяли с использованием гамма-бета-спектрометра MKC-AT1315 (УП «Атомтех», Беларусь). Рентгенограммы образцов записывали на дифрактометре D8 ADVANCE (Bruker, Германия), идентификацию кристаллических фаз проводили с использованием программы Qualx2.0 [17] и открытой кристаллографической базы (COD, SQLITE3). Распределение по размеру и медианное значение размера частиц ($d_{0,5}$) после ультразвуковой обработки определяли методом лазерной дифракции на анализаторе Mastersizer 2000 с модулем Hydro 2000S (Malvern, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве модельных отложений, вынесенных на ОИОС из активной зоны, был использован образец природного магнетита Fe_3O_4 . Рентгенограмма образца приведена на рис. 1 (спектр 1). Можно увидеть, что магнетит содержит примеси гематита Fe_2O_3 , обедненных по титану ильменитов состава $\text{Fe}_{1+x}\text{Ti}_{1-x}\text{O}_3$ и шпинеллоидов состава $\text{Fe}_{3-x}\text{Si}_x\text{O}_4$. Уже после 10 мин МХА наблюдается снижение рефлексов примесей (спектр 2), а при увеличении времени обработки до 30 мин происходит полная аморфизация примесей, о чем свидетельствует изменение соотношения пиков в спектрах: после 30–60 мин МХА наблюдаются дифракционная картина, характерная для чистых фаз магнетита и гематита.

Анализ распределения частиц магнетита в зависимости от продолжительности МХА показал, что в первые 10 мин происходит наиболее резкое снижение медианного размера ($d_{0,5}$), в дальнейшем наряду с увеличением доли частиц с размером менее 10 мкм, появляются крупные вторичные агрегаты (рис. 2). Такое поведение, характерное для мелкодисперсного магнетита и описанное в литературе [18], затрудняет изме-

рение реального размера частиц, однако плавное снижение медианного размера частиц с увеличением времени МХА показывает, что процесс измельчения магнетита продолжается.

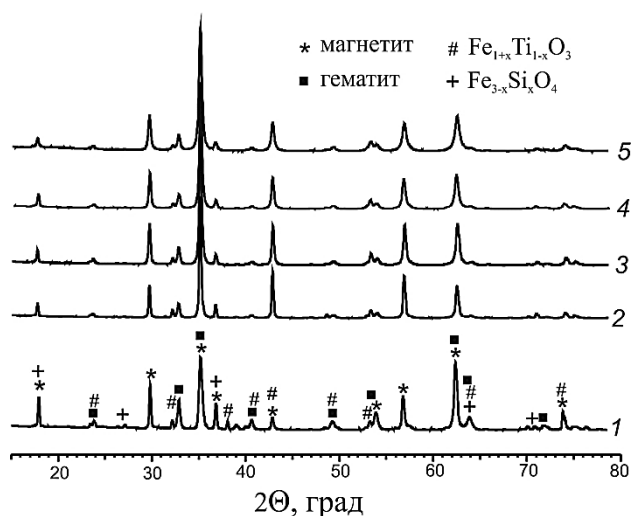


Рис. 1. Рентгенограммы магнетита: исходный образец (1); образцы после МХА в течение 10 (2), 20 (3), 30 (4) и 60 (5) мин

Fig. 1. X-ray diffraction patterns of magnetite: initial sample (1); samples after MCA for 10 (2), 20 (3), 30 (4), and 60 (5) minutes

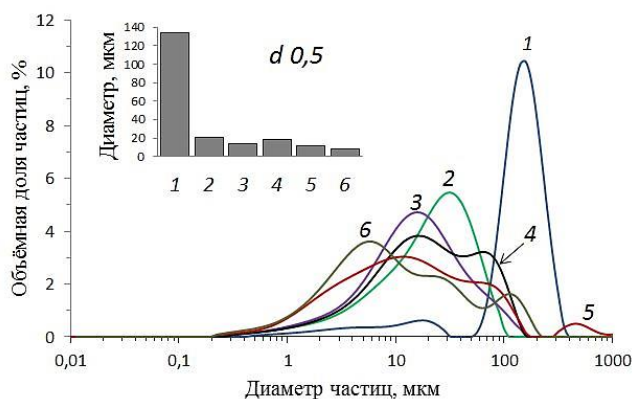


Рис. 2. Распределение и медианное значение размера частиц (врезка) магнетита: исходный образец (1); образцы после МХА в течение 10 (2), 20 (3), 30 (4), 60 (5) и 90 (6) мин

Fig. 2. Distribution and median values of the particle size (insert) for magnetite after MCA for 10 (2), 20 (3), 30 (4), 60 (5), and 90 (6) minutes

На рис. 3, а представлены результаты эксперимента по растворению магнетита трилоном Б до и после МХА. Влияние МХА выражается в резком возрастании концентрации железа в растворе пропорционально времени МХА в первые трое суток эксперимента. Данный эффект связан, вероятнее всего, с разрушением труднорастворимых примесных фаз, содержащих титан и кремний. Далее в наклоне кинетических кривых не обнаруживается зависимости от времени МХА для активированных образцов. Это можно объяснить разнонаправленным влиянием двух

факторов: с одной стороны, снижением размера частиц, с другой – усилением процессов агрегации мелкодисперсной фракции магнетита. При использовании 3 М азотной кислоты происходит постепенное возрастание концентрации железа в растворе, изломов на кинетических кривых не наблюдается. После 60 суток контакта в азотно-кислый раствор переходит в 3–4 раза больше ионов железа, чем в раствор трилона Б, однако, относительное содержание железа, отнесенное к количеству молей кислоты, значительно ниже, чем в эксперименте с трилоном Б (рис. 3, б). Наибольшая разница в относительном содержании железа в растворах трилона Б и азотной кислоты наблюдалась на третьи сутки эксперимента: в 155 раз для 10 мин МХА с плавным снижением до разницы в 80 раз для 90 мин МХА. Такое различие в относительном содержании железа объясняется различием механизмов растворения оксида железа в зависимости от состава раствора. В присутствии минеральных кислот (азотной, серной) растворение происходит главным образом при участии протонов, в то время как в присутствии органических лигандов на растворение в основном влияют процессы комплексообразования и переноса заряда [19].

Согласно литературным данным, процесс растворения оксидов железа в присутствии органических лигандов включает комплексообразование в растворе и на поверхности. Адсорбция, в результате которой образуется поверхностный комплекс, ослабляет связь металл-кислород на поверхности кристаллической решетки. Кроме того, комплексообразование с поверхностным Fe(III) облегчает перенос электронов между растворенным Fe(II) и поверхностным Fe(III) и способствует растворению поверхностного Fe(III) [20]. Эксперимент по растворению активированного магнетита органическими кислотами показывает, что эффективность растворения снижается в ряду щавелевая кислота > аскорбиновая > лимонная (табл. 1). Константы устойчивости комплексов железа со щавелевой и лимонной кислотами ($\log K_1$) различаются незначительно для Fe(II)/Fe(III) и составляют 4,7/9,4 и 3,2/11,85 соответственно. Существенное различие в растворении магнетита объясняется не только химией растворов этих кислот (диссоциация и комплексообразование), но и влиянием их структурных различий на поверхностное комплексообразование: щавелевая кислота занимает меньшую площадь на поверхности оксида, поэтому концентрация поверхностных комплексов выше [22], а в отношении аскорбиновой кислоты преобладает механизм восстановительного растворения (для щавелевой он дополняет поверхностное комплексообразование). Поэтому в щавелевой и аскорбиновой кислотах растворение протекает с большей эффективностью [23].

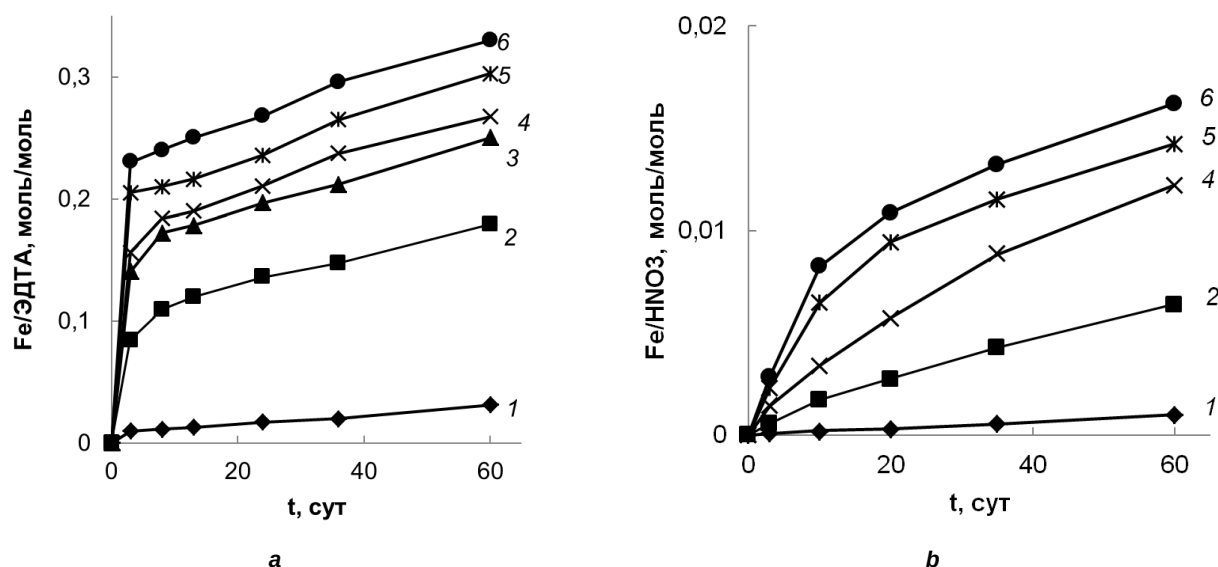


Рис. 3. Относительное содержание железа в 0,02 М раствора трилона Б (а) и 3 М раствора HNO_3 (б) в зависимости от времени растворения образцов: исходного магнетита (1) и магнетита после МХА в течение 10 (2), 20 (3), 30 (4), 60 (5) и 90 (6) минут. Ж:Т – 250 мл/г

Fig. 3. Relative iron content in 0.02 M solution of Trilon B (a) and 3 M solution of HNO_3 (b) depending on the dissolution time of the samples: initial magnetite (1) and magnetite after MCA for 10 (2), 20 (3), 30 (4), 60 (5), and 90 (6) minutes. L:S – 250 ml/g

Таблица 1. Относительная концентрация железа, перешедшего в 0,05 М растворы кислот при растворении магнетита, активированного в течение 30 мин (Ж:Т – 100 мл/г)

Table 1. Relative concentration of iron transferred to 0.05 M acids solutions at dissolution of magnetite activated for 30 minutes (L:S – 100 ml/g)

Кислота	$\text{pH}_{\text{исх}}$	Железо/кислота, моль/моль					
		t , сут.					
		1	3	7	10	20	30
Щавелевая	1,55	0,584	0,610	0,641	0,650	0,603	0,599
Аскорбиновая	2,78	0,148	0,340	0,455	0,510	0,524	0,529
Лимонная	2,22	0,033	0,063	0,097	0,131	0,165	0,227

Исходя из результатов эксперимента по растворению оксида кислотами было сделано предположение, что при МХА в присутствии органических кислот, добавленных в виде сухих реагентов, возможны твердофазные реакции, приводящие к

повышению эффективности растворения оксидов в присутствии трилона Б. В качестве активирующих добавок использовали сухие реагенты – щавелевую, аскорбиновую, лимонную кислоты, а также трилон Б (табл. 2).

Таблица 2. Относительная концентрация железа, перешедшего в 0,02 М раствор трилона Б при растворении магнетита, активированного в течение 30 мин

Table 2. Relative concentration of iron transferred to 0.02 M solution of Trilon B at dissolution of magnetite activated for 30 minutes

МХА		Растворение		Железо/трилон Б*, моль/моль			
Реагент (кислота)	Массовая доля реагента в смеси, %	Ж:Т, мл/г	Расчетная концентрация реагента в растворе, моль/л	t , сут.			
				1	7	20	30
Щавелевая	50	100	0,079	0,312	0,399	0,483	0,498
Аскорбиновая	50	100	0,056	0,091	0,128	0,202	0,205
Лимонная	50	100	0,052	0,127	0,171	0,286	0,271
Трилон Б	50	100	0,027	0,023	0,055	0,095	0,107
Щавелевая	50	500	0,016	0,717	0,897	0,942	0,962
Щавелевая	20	312	0,006	0,455	0,494	0,582	0,622
Без реагентов	–	100	–	0,033	0,122	0,174	0,208
Без реагентов	–	500	–	0,234	0,263	0,277	0,307

* Отнесено к количеству трилона Б, содержащемуся в 0,02 М растворе при указанных отношениях Ж:Т.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, количество перешедшего в раствор железа, отнесенное к содержанию в растворе трилона Б, увеличивается. Однако при сопоставлении данных, представленных в табл. 1 и 2, обнаруживается, что фактически происходит снижение растворимости оксида железа по сравнению с оксидом, активированным без реагентов: суммарная концентрация комплексообразующих агентов (добавленных при МХА кислот и содержащегося в растворе трилона Б) увеличивается (см. табл. 2) по сравнению с безреагентной МХА (см. табл. 1), а относительное содержание железа в растворе с учетом добавленных кислот снижается. Этот эффект хорошо виден на примере МХА с трилоном Б: после безреагентной МХА в раствор переходит больше железа, чем после МХА с трилоном Б, несмотря на то что в последнем случае суммарная концентрация трилона Б выше. Данное явление мы связываем с образованием труднорастворимой оболочки на поверхности частиц магнетита в результате твердофазной реакции с комплексообразующим реагентом.

Как видно из рентгенограмм образцов (рис. 4), после МХА с реагентами обнаруживается новая кристаллическая фаза. Для магнетита, активированного с трилоном Б, лимонной и аскорбиновой кислотами, она не идентифицирована, а в случае применения щавелевой кислоты идентифицируется оксалат железа (II) и остатки непрореагировавшей кислоты. При отмывке водой остатки реагента растворяются, а рефлексы оксалата железа сохраняются. Подобный случай описан в работе [24]: на поверхности частиц металлического железа образовалась оболочка оксалата железа (II) в результате взаимодействия сухой щавелевой кислоты и поверхностного гематита. Низкая растворимость образованных оболочек, вероятно, препятствует переходу железа в раствор, особенно при низких величинах Ж:Т. Увеличение отношения Ж:Т способствует растворению оксида железа, что показано для образца, активированного в присутствии щавелевой кислоты: относительная концентрация железа существенно возрастает по сравнению с безреагентной МХА (см. табл. 2).

Для исследования влияния МХА на эффективность дезактивации ОИОС был использован модельный катионит КУ-2-8, загрязненный радионуклидами ^{57}Co , входящими в состав магнитных

отложений и не удаляемыми при кислотно-щелочной регенерации. Как видно из табл. 3, МХА смолы незначительно повышает десорбцию радионуклидов ^{57}Co из магнетитовых отложений по сравнению с неактивированным образцом. При этом для образца, активированного в присутствии щавелевой кислоты, после 24 ч контакта с раствором степень дезактивации ниже, чем для неактивированного образца. Однако визуально, несмотря на низкую десорбцию радионуклидов в раствор, в образце, активированном в присутствии щавелевой кислоты, наблюдалось полное растворение отложений в течение первых часов. Низкая степень десорбции в данном случае объясняется вторичной сорбцией радионуклидов кобальта, высвобожденных при растворении отложений, на функциональных группах катионита. Данный эффект устраняется добавлением в раствор конкурирующих ионов: после добавления в растворы нитрата натрия до концентрации 200 г/л происходит десорбция этих радионуклидов из матрицы катионита.

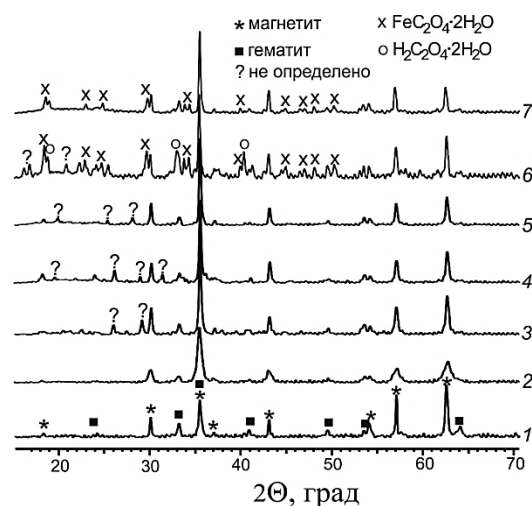


Рис. 4. Рентгенограммы магнетита: исходный образец (1); образцы после МХА без реагентов (2); с трилоном Б (3); лимонной (4), аскорбиновой (5), щавелевой (6) кислотами; после МХА со щавелевой кислотой и отмывки водой (7)

Fig. 4. X-ray diffraction patterns of magnetite: initial sample (1), samples after MCA without reagents (2); with Trilon B (3); with citric acid (4), with ascorbic acid (5), with oxalic acid (6); after MCA with oxalic acid and washing with water (7)

Таблица 3. Зависимость степени дезактивации (S, %) модельного катионита от условий предварительной обработки

Table 3. Dependence of the decontamination degree of the model cation-exchanger on the pretreatment conditions

Предварительная обработка катионита		S, %				
		Трилон Б, 0,02 М			NaNO ₃ , 200 г/л	
		t, ч			t, ч	
МХА	Реагент	1	3	24	1	24
-	-	9,08	11,8	13,9	20,5	23,2
+	-	19,8	20,1	21,2	26,9	33,6
+	H ₂ C ₂ O ₄ ·2H ₂ O	12,3	14,2	16,3	98,9	99,5

Следует отметить, что добавление щавелевой кислоты в дезактивирующий раствор при дезактивации катионита, активированного в отсутствие реагентов, интенсифицирует растворение модельных отложений. Однако скорость растворения отложений при использовании щавелевой кислоты в качестве активатора значительно выше. Так, в табл. 4 приведены результаты эксперимента по дезактивации модельного катионита с использованием одинакового коли-

чества реагента, но в первом случае щавелевая кислота вводилась при МХА, а во втором – в дезактивирующий раствор. Видно, что наиболее эффективной дезактивации можно достичь предварительной МХА отложений в присутствии сухой щавелевой кислоты. Небольшое снижение степени дезактивации по сравнению с экспериментом, результаты которого приведены в табл. 3, связано, вероятно, с более низким pH раствора.

Таблица 4. Зависимость степени дезактивации (S , %) катионита от способа введения щавелевой кислоты при дезактивации раствором, содержащим 0,02 моль/л трилона Б и 200 г/л NaNO_3

Table 4. Dependence of the degree of decontamination (S , %) of the cation-exchange resin on oxalic acid introducing mode at decontamination by solution containing 0.02 mol/L of Trilon B and 200 g/L of NaNO_3

Способ введения щавелевой кислоты	S , %		
	t , ч		
	1	3	24
При МХА	84,5	95,7	95,9
В дезактивирующий раствор	18,5	28,9	90,9

ВЫВОДЫ

Установлено, что при МХА модельного магнетита происходит значительное уменьшение объема частиц и разрушение примесных фаз ильменита и шпинелита, в результате чего ускоряется растворение оксидов железа в растворах трилона Б и азотной кислоты. Эффективность перехода железа в растворы кислот увеличивается пропорционально времени МХА. Предположено, что МХА в присутствии органических

кислот приводит к образованию на поверхности частиц оксида оболочек, затрудняющих растворение при невысоких значениях соотношения Ж:Т. Для образцов после МХА со щавелевой кислотой наблюдали растворение оболочек при повышении Ж:Т. МХА катионита КУ-2-8, загрязненного модельными отложениями, содержащими радионуклиды ^{57}Co , с последующей дезактивацией растворами на основе трилона Б позволила снизить активность катионита на 95–99,5%.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Hussain A., Al-Othmany D. Treatment and Conditioning of Spent Ion Exchange Resin from Nuclear Power Plant // *Advances in Physics Theories and Applications*. 2013. Vol. 15. P. 79–90.
2. Wang J., Wan Z. Treatment and disposal of spent radioactive ion-exchange resins produced in the nuclear industry // *Progress in Nuclear Energy*. 2015. Vol. 78. P. 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.pnucene.2014.08.003>.
3. Abdel Rahman R. O., Zaki A. A. Comparative analysis of nuclear waste solidification performance models: Spent ion exchanger-cement based wasteforms // *Process Safety and Environmental Protection*. 2020. Vol. 136. P. 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.12.038>.
4. Leybros A., Ruiz J. C., D'Halluin T., Ferreri E., Grandjean A. Treatment of spent ion exchange resins: Comparison between hydrothermal and acid leaching processes // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2020. Vol. 8, no. 4. Article number 103873. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103873>.
5. Xu T., Wang S., Li Y., Zhang J., Li J., Zhang Y., Yang C. Optimization and mechanism study on destruction of the simulated waste ion-exchange resin from the nuclear industry in supercritical water // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2020. Vol. 59, no. 40. P. 18269–18279. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c02732>.
6. Castro H. A., Rodríguez R. A., Luca V., Bianchi H. L. Pyrolysis and high performance plasma treatment applied to spent ion exchange resins // *Journal of Nuclear Engineering and Radiation Science*. 2019. Vol. 5, no. 2. Article number 020901. 8 p. <https://doi.org/10.1115/1.4042193>.
7. Palamarchuk M., Egorin A., Tokar E., Tutov M., Marinin D., Avramenko V. Decontamination of spent ion-exchangers contaminated with cesium radionuclides using resorcinol-formaldehyde resins // *Journal of Hazardous Materials*. 2017. Vol. 321. P. 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.09.005>.
8. Korchagin Yu. P., Arefev E. K., Korchagin E. Yu. Improvement of technology for treatment of spent radioactive ion-exchange resins at nuclear power stations // *Thermal Engineering*. 2010. Vol. 57, no. 7. P. 593–597. <https://doi.org/10.1134/S0040601510070104>.
9. Паламарчук М.С., Токарь Э.А., Тутов М.В., Егорин А.М. Дезактивация отработанных ионообменных смол, загрязнённых радионуклидами цезия и кобальта // *Экология и промышленность России*. 2019. Т. 23, № 4. С. 20–24. <https://doi.org/10.18412/1816-0395-2019-4-20-24>.
10. Shih Y.-H., Wen T.-J., Chen L.-C., Tsai T.-L. Characterization of solid particles sampled from con-

densates in boiling water reactor // Nuclear Science and Techniques. 2016. Vol. 27, no. 2. Article number 40. <https://doi.org/10.1007/s41365-016-0051-4>.

11. Tokar E. A., Matskevich A. I., Palamarchuk M. S., Parotkina Y. A., Egorin A. M. Decontamination of spent ion exchange resins contaminated with iron-oxide deposits using mineral acid solutions // Nuclear Engineering and Technology. 2021. Vol. 53, no. 9. P. 2918–2925. <https://doi.org/10.1016/j.net.2021.03.022>.

12. Ou Z., Li J., Wang Z. Application of mechanochemistry to metal recovery from second-hand resources: a technical overview // Environmental Science: Processes and Impacts. 2015. Vol. 17, no. 9. P. 1522–1530. <https://doi.org/10.1039/c5em00211g>.

13. Tan Q., Deng C., Li J. Innovative application of mechanical activation for rare earth elements recovering: process optimization and mechanism exploration // Scientific Reports. 2016. Vol. 6, no. 1. Article number 19961. 10 p. <https://doi.org/10.1038/srep19961>.

14. Tan Q., Li J. Recycling metals from wastes: a novel application of mechanochemistry // Environmental Science & Technology. 2015. Vol. 49, no. 10. P. 5849–5861. <https://doi.org/10.1021/es506016w>.

15. Van Loy S., Önal M. A. R., Binnemans K., Van Gerven T. Recovery of valuable metals from NdFeB magnets by mechanochemically assisted ferric sulfate leaching // Hydrometallurgy. 2020. Vol. 191. Article number 105154. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2019.105154>.

16. Wang M.-M., Zhang C.-C., Zhang F.-S. Recycling of spent lithium-ion battery with polyvinyl chloride by mechanochemical process // Waste Management. 2017. Vol. 67. P. 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.013>.

17. Altomare A., Corriero N., Cuocci C., Falcichio A., Moliterni A., Rizzi R. QUALX2.0: A qualitative phase analysis software using the freely available database POW_COD // Journal of Applied Crystallography. 2015. Vol. 48, no. 2. P. 598–603. <https://doi.org/10.1107/S1600576715002319>.

18. Salazar-Camacho C., Villalobos M., de la Luz Rivas-Sánchez M., Arenas-Alatorre J., Alcaraz-Cienfuegos J., Gutiérrez-Ruiz M.E. Characterization and surface reactivity of natural and synthetic magnetites // Chemical Geology. 2013. Vol. 347. P. 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.03.017>.

19. Salmimies R., Mannila M., Kallas J., Häkkinen A. Acidic dissolution of magnetite: Experimental study on the effects of acid concentration and temperature // Clays and Clay Minerals. 2011. Vol. 59, no. 2. P. 136–146. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2011.0590203>.

20. Biswakarma J., Kang K., Borowski S. C., Schenkeveld W. D. C., Kraemer S. M., Hering J. G., et al. Fe(II)-catalyzed ligand-controlled dissolution of iron(hydr)oxides // Environmental Science & Technology. 2019. Vol. 53, no. 1. P. 88–97. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03910>.

21. Kim E. J., Lee J.-C., Baek K. Abiotic reductive extraction of arsenic from contaminated soils enhanced by complexation: Arsenic extraction by reducing agents and combination of reducing and chelating agents // Journal of Hazardous Material. 2015. Vol. 283. P. 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.055>.

22. Kallay N., Matijević E. Adsorption at solid/solution interfaces. 1. Interpretation of surface complexation of oxalic and citric acids with hematite // Langmuir. 1985. Vol. 1, no. 2. P. 195–201. <https://doi.org/10.1021/la00062a003>.

23. Zhang Y., Kallay N., Matijević E. Interactions of metal hydrous oxides with chelating agents. 7. Hematite-oxalic acid and -citric acid systems // Langmuir. 1985. Vol. 1, no. 2. P. 201–206. <https://doi.org/10.1021/la00062a004>.

24. Wu S., Deng S., Ma Z., Liu Y., Yang Y., Jiang Y. Ferrous oxalate covered ZVI through ball-milling for enhanced catalytic oxidation of organic contaminants with persulfate // Chemosphere. 2022. Vol. 287. Part 4. Article number 132421. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132421>.

REFERENCES

1. Hussain A., Al-Othmany D. Treatment and Conditioning of Spent Ion Exchange Resin from Nuclear Power Plant. *Advances in Physics Theories and Applications*. 2013;15:79–90.

2. Wang J., Wan Z. Treatment and disposal of spent radioactive ion-exchange resins produced in the nuclear industry. *Progress in Nuclear Energy*. 2015;78:47–55. <https://doi.org/10.1016/j.pnucene.2014.08.003>.

3. Abdel Rahman R. O., Zaki A. A. Comparative analysis of nuclear waste solidification performance models: Spent ion exchanger-cement based wasteforms. *Process Safety and Environmental Protection*. 2020;136:115–125. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.12.038>.

4. Leybros A., Ruiz J. C., D'Halluin T., Ferreri E., Grandjean A. Treatment of spent ion exchange re-

sins: Comparison between hydrothermal and acid leaching processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2020;8(4):103873. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103873>.

5. Xu T., Wang S., Li Y., Zhang J., Li J., Zhang Y., Yang C. Optimization and mechanism study on destruction of the simulated waste ion-exchange resin from the nuclear industry in supercritical water. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2020; 59(40):18269–18279. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c02732>.

6. Castro H. A., Rodríguez R. A., Luca V., Bianchi H. L. Pyrolysis and high performance plasma treatment applied to spent ion exchange resins. *Journal of Nuclear Engineering and Radiation Science*. 2019;5(2):020901. <https://doi.org/10.1115/1.4042193>.

7. Palamarchuk M., Egorin A., Tokar E., Tutov M., Marinin D., Avramenko V. Decontamination of spent ion-exchangers contaminated with cesium radionuclides using resorcinol-formaldehyde resins. *Journal of Hazardous Materials*. 2017;321:326–334. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.09.005>.
8. Korchagin Yu. P., Arefev E. K., Korchagin E. Yu. Improvement of technology for treatment of spent radioactive ion-exchange resins at nuclear power stations. *Thermal Engineering*. 2010;57(7):593–597. <https://doi.org/10.1134/S0040601510070104>.
9. Palamarchuk M. S., Tokar E. A., Tutov M. V., Yegorin A. M. Deactivation of spent ion-exchange resins contaminated by cesium and cobalt radionuclides. *Ekologia i promyshlennost Rossii = Ecology and Industry of Russia*. 2019;23(4):20–24. (In Russian). <https://doi.org/10.18412/1816-0395-2019-4-20-24>.
10. Shih Y.-H., Wen T.-J., Chen L.-C., Tsai T.-L. Characterization of solid particles sampled from condensates in boiling water reactor. *Nuclear Science and Techniques*. 2016;27(2):40. <https://doi.org/10.1007/s41365-016-0051-4>.
11. Tokar E. A., Matskevich A. I., Palamarchuk M. S., Parotkina Y. A., Egorin A. M. Decontamination of spent ion exchange resins contaminated with iron-oxide deposits using mineral acid solutions. *Nuclear Engineering and Technology*. 2021;53(9):2918–2925. <https://doi.org/10.1016/j.net.2021.03.022>.
12. Ou Z., Li J., Wang Z. Application of mechanochemistry to metal recovery from second-hand resources: a technical overview. *Environmental Science: Processes and Impacts*. 2015;17(9):1522–1530. <https://doi.org/10.1039/c5em00211g>.
13. Tan Q., Deng C., Li J. Innovative application of mechanical activation for rare earth elements recovering: process optimization and mechanism exploration. *Scientific Reports*. 2016;6(1):19961. <https://doi.org/10.1038/srep19961>.
14. Tan Q., Li J. Recycling metals from wastes: a novel application of mechanochemistry. *Environmental Science & Technology*. 2015;49(10):5849–5861. <https://doi.org/10.1021/es506016w>.
15. Van Loy S., Önal M. A. R., Binnemans K., Van Gerven T. Recovery of valuable metals from NdFeB magnets by mechanochemically assisted ferric sulfate leaching. *Hydrometallurgy*. 2020;191:105154. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2019.105154>.
16. Wang M.-M., Zhang C.-C., Zhang F.-S. Recycling of spent lithium-ion battery with polyvinyl chloride by mechanochemical process. *Waste Management*. 2017;67:232–239. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.013>.
17. Altomare A., Corriero N., Cuocci C., Falcichio A., Moliterni A., Rizzi R. QUALX2.0: A qualitative phase analysis software using the freely available database POW_COD. *Journal of Applied Crystallography*. 2015;48(2):598–603. <https://doi.org/10.1107/S1600576715002319>.
18. Salazar-Camacho C., Villalobos M., de la Luz Rivas-Sánchez M., Arenas-Alatorre J., Alcaraz-Cienfuegos J., Gutiérrez-Ruiz M.E. Characterization and surface reactivity of natural and synthetic magnetites. *Chemical Geology*. 2013;347:233–245. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.03.017>.
19. Salmimies R., Mannila M., Kallas J., Häkkinen A. Acidic dissolution of magnetite: Experimental study on the effects of acid concentration and temperature. *Clays and Clay Minerals*. 2011;59(2):136–146. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2011.0590203>.
20. Biswakarma J., Kang K., Borowski S. C., Schenkeveld W. D. C., Kraemer S. M., Hering J. G., et al. Fe(II)-catalyzed ligand-controlled dissolution of iron(hydr)oxides. *Environmental Science & Technology*. 2019;53(1):88–97. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03910>.
21. Kim E. J., Lee J.-C., Baek K. Abiotic reductive extraction of arsenic from contaminated soils enhanced by complexation: Arsenic extraction by reducing agents and combination of reducing and chelating agents. *Journal of Hazardous Material*. 2015;283:454–461. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.055>.
22. Kallay N., Matijević E. Adsorption at solid/solution interfaces. 1. Interpretation of surface complexation of oxalic and citric acids with hematite. *Langmuir*. 1985;1(2):195–201. <https://doi.org/10.1021/la00062a003>.
23. Zhang Y., Kallay N., Matijević E. Interactions of metal hydrous oxides with chelating agents. 7. Hematite-oxalic acid and -citric acid systems. *Langmuir*. 1985;1(2):201–206. <https://doi.org/10.1021/la00062a004>.
24. Wu S., Deng S., Ma Z., Liu Y., Yang Y., Jiang Y. Ferrous oxalate covered ZVI through ball-milling for enhanced catalytic oxidation of organic contaminants with persulfate. *Chemosphere*. 2022;287(4):132421. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132421>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

М. С. Паламарчук,
научный сотрудник,
Институт химии ДВО РАН,
690022, г. Владивосток,
пр-т 100-летия Владивостока, 159,
Российская федерация,
marina_p@ich.dvo.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3305-741X>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Marina S. Palamarchuk,
Researcher,
Institute of Chemistry FEB RAS,
159, 100-letya Vladivostoka Ave.,
Vladivostok, 690022,
Russian Federation,
marina_p@ich.dvo.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3305-741X>

Д. Х. Шлык,

к.х.н., научный сотрудник,
Институт химии ДВО РАН,
690022, г. Владивосток,
пр-т 100-летия Владивостока, 159,
Российская федерация,
daria79@list.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4247-4872>

С. Ю. Братская,

д.х.н., член-корреспондент РАН,
заведующая отделом сорбционных технологий
и функциональных материалов,
Институт химии ДВО РАН,
690022, г. Владивосток,
пр-т 100-летия Владивостока, 159,
Российская федерация,
sbratska@ich.dvo.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4954-0422>

Darya Kh. Shlyk,

Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
Institute of Chemistry FEB RAS,
159, 100-letya Vladivostoka Ave.,
Vladivostok, 690022,
Russian Federation,
daria79@list.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4247-4872>

Svetlana Yu. Bratskaya,

Dr. Sci. (Chemistry), Corresponding
member of RAS,
Head of the Department of Sorption
Technologies and Functional Materials,
Institute of Chemistry FEB RAS,
159, 100-letya Vladivostoka Ave.,
Vladivostok, 690022,
Russian Federation,
sbratska@ich.dvo.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4954-0422>

Вклад авторов

Паламарчук М. С. – концептуализация; методология; проведение экспериментов; анализ и визуализация экспериментальных данных; написание текста.

Шлык Д. Х. – проведение экспериментов; анализ и визуализация экспериментальных данных.

Братская С. Ю. – методология; проведение экспериментов; анализ и визуализация экспериментальных данных; доработка текста.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 29.10.2021.

Одобрена после рецензирования 15.11.2021.

Принята к публикации 30.11.2021.

Contribution of the authors

Palamarchuk M. S. – conceptualization; methodology; investigation; visualization; writing – original draft.

Shlyk D. Kh. – investigation; visualization.

Bratskaya S. Yu. – methodology; investigation; visualization; writing – review and 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.

Information about the article

The article was submitted 29.10.2021.

Approved after reviewing 15.11.2021.

Accepted for publication 30.11.2021.

Научная статья

УДК 66.061

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-673-680>



Использование метода ИК-спектроскопии при анализе эффективности селективной очистки масляных экстрактов

Вероника Игоревна Жолнеркевич, Евгения Ивановна Грушова

Белорусский государственный технологический университет, г. Минск, Беларусь

Автор, ответственный за переписку: Жолнеркевич Вероника Игоревна, zholnerkevichv@mail.ru

Аннотация. Одним из способов очистки от канцерогенных углеводородов масляных экстрактов, применяемых в качестве масел-пластификаторов для резинотехнических изделий, является жидкостная экстракция. Эффективность этого метода во многом определяется селективными и растворяющими свойствами разделяющего агента. Однако при осуществлении сравнительного анализа перспективных методов экстрагирования важно также использовать оперативные методы исследования состава получаемых продуктов. Рассмотрено влияние природы селективных растворителей на эффективность очистки масляных экстрактов от полициклических ароматических компонентов, включающих канцерогенные углеводороды (бенз(а)пирен, бенз(е)пирен, бенз(а)антрацен, хризен, бенз(б)флуорантен и т.д.). Используя метод ИК-Фурье спектроскопии, исследован структурно-групповой состав образцов очищенного масляного экстракта и экстрактов второй ступени очистки. Установлено, что по эффективности экстрагирования полициклических ароматических углеводородов из масляных экстрактов исследуемые растворители можно расположить в следующий возрастающий ряд: диметилсульфоксид < N-метилпирролидон + 10% масс. этиленгликоля < N-метилпирролидон + 50% масс. триэтиленгликоля. При использовании растворителя N-метилпирролидон + 50% масс. триэтиленгликоля снижается доля полиалкилзамещенных и конденсированных ароматических структур в очищенном масляном экстракте на 16,8%, выход масляного экстракта возрастает более чем на 25% масс. в сравнении с экстракционной очисткой растворителем N-метилпирролидон + этиленгликоль, который обеспечивает очистку масляных экстрактов согласно требованиям Евросоюза (Директива № 2005/69/ЕС). Следовательно, растворитель N-метилпирролидон + 50% масс. триэтиленгликоля целесообразно использовать для очистки масляных экстрактов от компонентов, оказывающих техногенное воздействие на окружающую среду и здоровье человека, а метод ИК-спектроскопии – при анализе эффективности селективной очистки масляных экстрактов.

Ключевые слова: масляный экстракт, растворитель, рафинат, структурно-групповой состав, ИК-спектроскопия, селективная очистка

Для цитирования: Жолнеркевич В. И., Грушова Е. И. Использование метода ИК-спектроскопии при анализе эффективности селективной очистки масляных экстрактов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 673–680. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-673-680>.

CHEMICAL TECHNOLOGY

Original article

IR spectroscopy for analysing solvent extraction efficiency of oil extracts

Veronika I. Zholnerkevich, Evgeniya I. Grushova

Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus

Corresponding author: Veronika I. Zholnerkevich, zholnerkevichv@mail.ru

Abstract. Solvent extraction is a method for purifying oil extracts, which are used as oil-plasticisers for industrial rubber goods, from cancerogenic hydrocarbons. The efficiency of this method is mainly determined by the selectivity and solvent properties of a separating agent. However, when carrying out a comparative analysis of promising extraction methods, it is necessary to use real-time methods for studying the composition of

the resulting products. The purification efficiency of oil extracts from polycyclic aromatic components, including carcinogenic hydrocarbons (benzo[a]pyrene, benzo[e]pyrene, benzo[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, etc.), was evaluated depending upon the nature of selective solvents. The structure-group composition of the purified oil extracts and those at the second-stage of purification was determined by FTIR spectroscopy. It was found that the extraction efficiency of the studied solvents towards polycyclic aromatic hydrocarbons from oil extracts increases in the following order: dimethyl sulfoxide < N-methylpyrrolidone + 10 wt% ethylene glycol < N-methylpyrrolidone + 50 wt% triethylene glycol. When using a solvent comprising N-methylpyrrolidone + 50 wt% triethylene glycol, the proportion of polyalkyl-substituted and condensed aromatic structures in the purified oil extract decreases by 16.8%; the oil extract yield increases by over 25 wt% in contrast to extraction with N-methylpyrrolidone + ethylene glycol mixture, which meets the requirements of the European Union for oil extract purification (Directive No. 2005/69/EC). Therefore, we recommend the solvent comprising N-methylpyrrolidone + 50 wt% triethylene glycol for purifying oil extracts from components having a technogenic impact on the environment and human health and IR spectroscopy for efficiency assessment of solvent extraction of oil extracts.

Keywords: oil extract, solvent, refined oil, structure-group composition, IR spectroscopy, solvent extraction

For citation: Zholnerkevich V. I., Grushova E. I. IR spectroscopy for analysing solvent extraction efficiency of oil extracts. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):673-680. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-673-680>.

ВВЕДЕНИЕ

Производство смазочных материалов из нефтяного сырья – это сложный многостадийный процесс, включающий ряд этапов экстракционной очистки дистилятных и остаточных нефтепродуктов от различных нежелательных компонентов. При этом получаемый на каждой стадии экстракционного разделения побочный продукт (экстракт, получаемый в процессе селективной очистки масляного сырья, концентрат парафиновых углеводородов – в процессе депарафинизации рафинатов селективной очистки, асфальт – в процессе деасфальтизации остатка вакуумной перегонки мазута) также находит свое применение в различных областях народного хозяйства. Однако постоянное повышение экологических требований при использовании опасных веществ и препаратов обуславливает необходимость разработки мероприятий, обеспечивающих снижение техногенных воздействий продуктов нефтепереработки на окружающую среду и здоровье человека. Особое место по объемам производства и использования в шинной промышленности занимают масляные экстракты [1–7], представляющие собой концентрат полициклических ароматических углеводородов, в том числе и канцерогенных ароматических углеводородов (например, бенз(а)-пирен, бенз(е)пирен, бенз(а)антрацен, хризен, бенз(б)флуорантен и т.д.), от которых необходимо очищать масляные фракции нефти.

На сегодняшний день предложены разные подходы для решения данной проблемы: компаундирование очищенных от канцерогенных компонентов ароматических и парафиновых углеводородов [1]; методы алкилирования опасных конденсированных ароматических углеводородов, ответственных за мутацию ДНК в альфа-положение с целью снижения вероятности уча-

стия «вау»-протона в реакциях электрофильного замещения [2]; очистка экстрактов селективной очистки масел сжиженным пропаном с последующим разделением являющегося нефтяным пластификатором деасфальтизата, освобожденного от асфальтенов и смол при нагреве до 80–90 °С, на две фракции: с повышенным содержанием парафино-нафтеновых углеводородов (верхний слой) и повышенным содержанием ароматических углеводородов (нижний слой), [3], и др. При этом наибольшее внимание уделяется экстракционным процессам очистки масел-пластификаторов от нежелательных компонентов [1–5]. В то же время актуальной задачей является разработка не только способов получения канцерогенно-безопасных масел-пластификаторов для шин, каучуков, но и методов оперативного контроля над их эффективностью, в том числе и при применении процессов экстракции с использованием различных разделяющих агентов на основе тщательного анализа получаемых продуктов.

Целью настоящей работы являлась оценка эффективности очистки полученного в процессе экстракции нефтяного масляного дистилята экстракта селективным растворителем на основе анализа результатов ИК-спектрометрии структурно-группового состава полученных экстрактов и рафинатов. В качестве селективных растворителей для экстракционной очистки использовали известные разделяющие агенты: диметилсульфоксид (ДМСО) [4]; N-метилпирролидон (N-МП) + 10% масс. этиленгликоля (ЭГ) [6] и новый растворитель состава 50% масс. N-метилпирролидона и 50% масс. триэтиленгликоля (ТЭГ).

Как известно [6], в процессе экстракционной очистки растворитель N-МП + 10% масс. ЭГ позволяет получить масло, удовлетворяющее экологическим требованиям Евросоюза (Директива № 2005/69/ЕЕС) по содержанию бензо(а)пирена

(<1 мг/кг), восьми канцерогенных полициклоаренов (<10 мг/кг). ДМСО, используемый для селективной очистки масла, не позволяет выполнить эти требования. Однако анализ содержания полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) методом, изложенным в стандарте DIN EN 16143-2013 (Нефтепродукты. Определение содержания бензо(а)пирена и выбранных полициклических ароматических углеводородов в наполнительных маслах), включающим жидкостную хроматографию для двойной предварительной очистки и хромато-масс-спектрометрию (ГХ/МС), достаточно сложен и требует применения весьма дорогостоящей аппаратуры, что вносит определенные сложности в разработку новых экстракционных растворителей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы очищенного ароматического масла получали в результате реализации жидкостной экстракции в две стадии, схема которой представлена на рис. 1.

Жидкостную экстракцию осуществляли в термостатированной делительной воронке, обогреваемой водой из термостата. Рафинатный раствор промывали дистиллированной водой для удаления растворителя. Полученный рафинат осушали цеолитом NaA. Для выделения масляного экстракта из экстрактного раствора использовали вакуумную перегонку.

На первой стадии масляный экстракт (МЭ1) выделяли по промышленной технологии [8] путем селективной очистки вакуумного дистиллята ВД-3, полученного в процессе вакуумной пере-

гонки мазута в ОАО «Нафтан», промышленным экстрагентом N-метилпирролидон при 50 °С и кратности растворитель : сырье, 2:1 мас. ч. Далее масляный экстракт (МЭ1) первой ступени подвергали очистке от ПАУ методом экстракции диметилсульфоксидом или N-МП, содержащим 10% масс. ЭГ, или растворителем состава 50% масс. N-МП + 50% масс. триэтиленгликоля при 50 °С и кратности растворитель : сырье, равной 2:1 мас. ч. Получали рафинат, то есть очищенный масляный экстракт (ОМЭ), и масляный экстракт второй ступени очистки (МЭ2).

Определение спектральных характеристик, структурно-группового и группового химического составов ароматических масел до и после экстракционной очистки осуществляли методом ИК-спектроскопии. ИК-спектры анализируемых образцов масляных экстрактов регистрировали с помощью ИК-Фурье спектрометра ФСМ 1202 (ООО «Инфраспек», Россия) в интервале волновых чисел 1800–400 см⁻¹. Испытуемый образец наносили в виде тонкого слоя на кристалл KBr. Отнесение полос поглощения в ИК-спектрах проводилось в соответствии с литературными данными¹ [9–13]. На ИК-спектрах рафинатов (очищенные масляные экстракты) и экстрактов второй ступени очистки фиксировали широкий набор полос поглощения, соответствующих: ароматическим структурам разного строения – 1600–1603, 865–867, 811–812, 746–747 см⁻¹; нафтоновым структурам – 940–953 и 1027–1033 см⁻¹, алкановым структурам – 720–726, 1376–1378 и 1458–1463 см⁻¹.

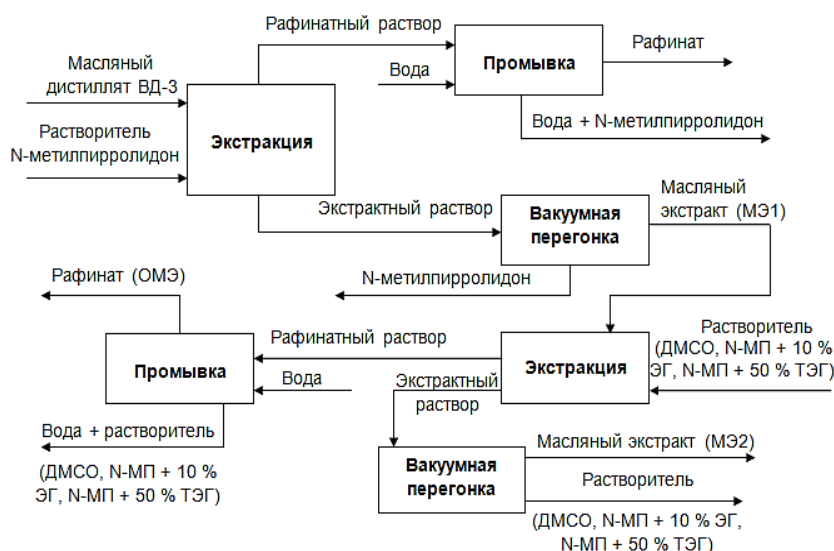


Рис. 1. Блок-схема получения и очистки масляного экстракта

Fig. 1. Block diagram of obtaining and purifying oil extract

¹Тарасевич Б. Н. Основы ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье. Подготовка проб в ИК-спектроскопии: пособие к спецпрактикуму по физико-химическим методам для студентов-дипломников кафедры органической химии. М.: Изд-во МГУ, 2012. 22 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты очистки указанными растворителями масляного экстракта (МЭ1), выделенного в процессе селективной очистки вакуумного дистиллята ВД-3 с помощью N-метилпирролидона, представлены в табл. 1.

При анализе эффективности выбранного способа «облагораживания» масляного экстракта необходимо исследовать его структурно-групповой состав.

Охарактеризовать усредненную структуру молекулы нефтяного масла можно с помощью отношения интенсивностей полос поглощения, а также отношения оптических плотностей полос поглощения на соответствующих частотах [12–16].

На основании ИК-спектров (рис. 2) оценивали условное содержание и соотношение ароматических и парафиновых структур в очищенном масляном экстракте (D – оптическая плотность):

$C_1 = D_{1600} / (D_{720} + D_{1380})$ – условное отношение общего содержания ароматических структур к содержанию парафиновых структур;

$C_2 = (D_{780} + D_{810} + D_{860}) / D_{1600}$ – условное отношение содержания полиалкилзамещенных моно-, би- и трициклических ароматических структур к общему содержанию ароматических структур;

$C_3 = (D_{810} + D_{860}) / D_{1600}$ – условное отношение полиалкилзамещенных би- и трициклических структур к общему содержанию ароматических структур;

$C_4 = (D_{780} + D_{810} + D_{860}) / (D_{720} + D_{1380})$ – условное отношение содержания полиалкилзамещенных моно-, би- и трициклических ароматических структур к содержанию парафиновых структур;

$C_5 = D_{1600} / D_{1460}$ – условное содержание ароматических структур;

$C_6 = (D_{810} + D_{860}) / D_{1460}$ – условное содержание полиалкилзамещенных моно- и конденсированных ароматических структур;

$C_7 = D_{780} / D_{1460}$ – условное содержание бизамещенных структур бензола;

$C_8 = (D_{720} + D_{1380}) / D_{1460}$ – условное содержание парафиновых структур нормального и изостроения.

Результаты анализа данных ИК-спектров представлены в табл. 2 и на рис. 3.

Анализ группового состава масляных продуктов осуществляли на основе следующих показателей [12]:

$$\% \text{Ал} = (D_{720} + D_{1450} + D_{1380}) \cdot 100 / (D_{720} + D_{1450} + D_{1380} + D_{1030} + D_{970} + D_{1600} + D_{870} + D_{810} + D_{750});$$

$$\% \text{Н} = (D_{970} + D_{1030}) \cdot 100 / (D_{720} + D_{1450} + D_{1380} + D_{1030} + D_{970} + D_{1600} + D_{870} + D_{810} + D_{750});$$

$$\% \text{Ар} = (D_{1600} + D_{870} + D_{810} + D_{750}) \cdot 100 / (D_{720} + D_{1450} + D_{1380} + D_{1030} + D_{970} + D_{1600} + D_{870} + D_{810} + D_{750}),$$

где, %Ал – содержание алифатических структур; %Н – содержание нафтеновых структур; %Ар – содержание ароматических структур.

Таблица 1. Показатели экстракции очищенного масляного экстракта ($n_D^{50} = 1,5470$)

Table 1. Indicators of extraction purification of oil extract ($n_D^{50} = 1.5470$)

Показатель	Растворитель		
	ДМСО	Н-МП + 10% ЭГ	Н-МП + 50% ТЭГ
Выход ОМЭ, % масс.	91,4	60,3	87,1
Показатель преломления ОМЭ, n_D^{50}	1,5445	1,5170	1,5390
Анилиновая точка для ОМЭ, °С	75,0	78,0	76,7
Показатель преломления МЭ2, n_D^{50}	1,5938	1,5550	1,5867

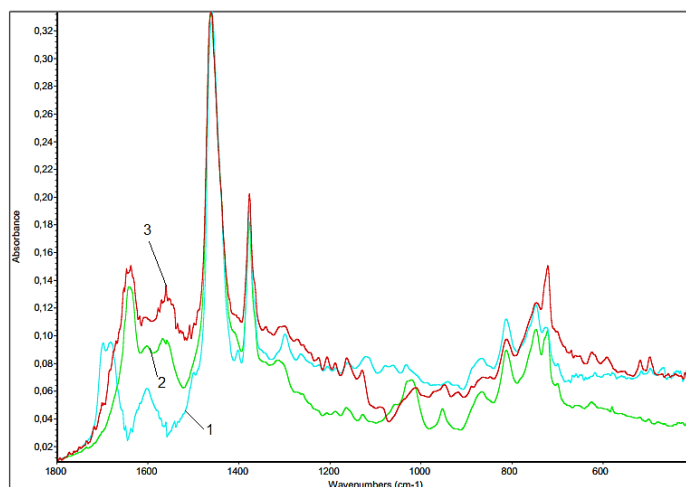


Рис. 2. ИК-спектры масляных экстрактов, очищенных растворителями: N-метилпирролидон + 50% масс. триэтиленгликоля (1); диметилсульфоксид (2); N-метилпирролидон + 10% масс. этиленгликоль (3)

Fig. 2. IR spectra of solvent purified aromatic oil: N-MP + 50 wt% TEG (1); DMSO (2); N-MP + 10 wt% EG (3)

Таблица 2. Структурно-групповой состав очищенных масляных экстрактов по данным ИК-спектроскопии

Table 2. Structural and group composition of purified oil extracts according to IR spectrometry data

Показатель	Экстракт первой ступени (сырье)	Растворитель		
		ДМСО	N-МП +10%ЭГ	N-МП+50%ТЭГ
C ₁	0,66	0,65	0,62	0,63
C ₂	2,74	3,87	3,66	3,04
C ₃	1,93	2,37	2,61	2,17
C ₄	1,77	2,31	2,26	1,90

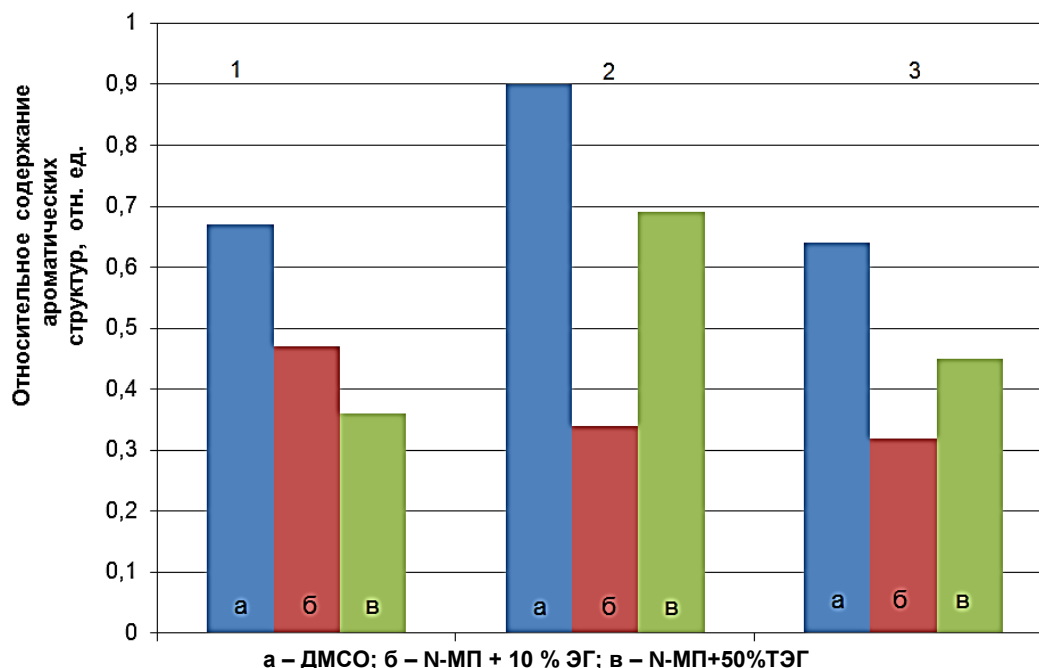


Рис. 3. Влияние природы экстрагента на относительное содержание ароматических структур в очищенном масляном экстракте;

1, 2, 3 – относительное содержание ароматических структур ($C_5^{OMЭ} / C_5^{MЭ1}$);
биалкилзамещенных структур бензола ($C_7^{OMЭ} / C_7^{MЭ1}$);
полиалкилзамещенных би- и трициклических ароматических структур ($C_6^{OMЭ} / C_6^{MЭ1}$) соответственно

Fig. 3. Influence of the extractant nature on the conditional relative content of aromatic structures in the purified oil extract;

1, 2, 3 – relative content of aromatic structures ($C_5^{OMЭ} / C_5^{MЭ1}$) bialkyl substituted benzene ($C_7^{OMЭ} / C_7^{MЭ1}$);
polyalkyl substituted bi- and tricyclic structures ($C_6^{OMЭ} / C_6^{MЭ1}$) respectively

Сопоставительный анализ результатов ИК-спектроскопии позволил установить следующее. Очистка масляного экстракта растворителем N-МП + 50% масс. ТЭГ обеспечивает наименьший переход ароматических структур в целевой продукт – ОМЭ. Наибольшее содержание ароматических структур в ОМЭ наблюдается при селективной очистке масляного экстракта ДМСО. Однако ДМСО и растворитель N-МП + 50% масс. ТЭГ позволяют лучше сохранить в составе ОМЭ замещенные ароматические структуры, которые не относятся к группе канцерогенных соединений.

Согласно данным, представленным в табл. 2, обработка экстракта селективной очистки масляных дистиллятов растворителями мало влияет на величину C_1 . Однако (ОМЭ) увеличение показателей C_2 и C_3 свидетельствуют о том, что в целевом продукте увеличивается содержание замещенных ароматических структур по отношению к ароматическим структурам. При этом в наибольшей степени этот процесс наблюдается при очистке сырья

ДМСО и смесью N-МП + 10% масс. ЭГ. В результате наименьшее значение отношения замещенных ароматических структур к парафиновым структурам наблюдается для масла, полученного при очистке сырья смесью N-МП + 50% масс. ТЭГ.

Анализ экстрактов второй ступени селективной очистки (табл. 3), показывает, что наибольшее содержание ароматических структур (C_5) наблюдается в МЭ2 при очистке сырья смесью N-МП + 50% масс. ТЭГ и, соответственно, в МЭ2 переходит меньше парафиновых структур нормального и изостроения: C_8 для системы растворителей N-МП + 10% масс. ЭГ равно 5,23, а для системы растворителей N-МП + 50% масс. ТЭГ – 4,85.

Очистка экстрактов селективными растворителями ДМСО, N-МП + 10% масс. ЭГ, N-МП + 50% масс. ТЭГ (табл. 4) позволяет практически в 2 раза снизить содержание ароматических углеводородов в очищенном масляном экстракте и повысить содержание парафино-нафтеновых углеводородов.

Поскольку основу масляных фракций нефти

составляют гибридные молекулы углеводов и гетероорганических соединений [19, 20], то есть они содержат парафиновые, нафтеновые и ароматические структуры, то, согласно данным ИК-спектроскопии, голаядерные полициклические ароматические структуры при селективной очистке масляного экстракта (МЭ1) концентрируются в масляном экстракте второй ступени очистки (МЭ2).

ские ароматические структуры при селективной очистке масляного экстракта (МЭ1) концентрируются в масляном экстракте второй ступени очистки (МЭ2).

Таблица 3. Структурно-групповой состав экстрактов второй ступени (МЭ2)

Table 3. Structural and group composition of extracts of the second stage

Растворитель	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈
N-МП + 10% масс. ЭГ	2,73	6,18	2,52	5,23
N-МП + 50% масс. ТЭГ	3,70	6,18	2,24	4,85
Исходное сырье (МЭ1)	4,01	7,73	3,15	6,21

Таблица 4. Групповой состав очищенных масляных экстрактов

Table 4. Group composition of purified oil extract

Показатель	Сырье (МЭ1)	ОМЭ		
		ДМСО	N-МП + 10% ЭГ	N-МП + 50% ТЭГ
%Ал	31,83	18,77	29,85	29,71
%Н	36,31	62,45	51,73	51,76
%Ар	31,86	18,78	18,42	18,53

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сопоставительный анализ структурно-группового и группового химического составов исходных масляных экстрактов, очищенных масляных экстрактов и экстрактов второй ступени селективной очистки методом ИК-спектроскопии позволил установить, что селективная очистка масляного экстракта первой ступени селективными растворителями позволяет снизить содержание ароматических структур в ОМЭ. Эффективность очистки с целью «облагораживания» масляного экстракта зависит от при-

роды используемого экстрагента. Растворитель N-метилпирролидон + 50% масс. триэтиленгликоля обеспечивает более высокий выход рафината за счет его более высокой избирательной способности при отделении ПАУ от замещенных ПАУ в сравнении с растворителями ДМСО и N-МП + ЭГ. При этом необходимо отметить, что метод ИК-спектроскопии при осуществлении сопоставительного анализа даже малых количеств исследуемых веществ позволяет получить их качественную характеристику.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Шалашова А. А., Новоселов А. С., Лазарев М. А., Щепалов А. А. Некоторые параметры рафинатов и масел пластификаторов для автомобильных шин после очистки от канцерогенноопасных компонентов путем использования пропиленкарбоната как экстрагента исходных сырьевых смесей // Вестник технологического университета. 2017. Т. 20, N 20. С. 64–66.
2. Шалашова А. А., Семенычева Л. Л., Новоселов А. С., Лазарев М. А., Щепалов А. А. Алкилирование нефтяной экстрагированной тяжелой фракции некоторыми субстратами с целью снижения содержания опасны ПАУ // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Химия. 2019. Т. 11, N 1. С. 42–49. <https://doi.org/10.14529/chem190105>.
3. Antonova S. A., Tonkonogov B. P., Kislyakova A. Yu., Dorogochinskaya V. A. Production technologies of various types of environmentally friendly plasticizer oils // Chemistry and technology of fuels and oils. 2020. Vol. 56, no. 3. P. 373–389. <https://doi.org/10.1007/s10553-020-01148-0>.
4. Заглядова С. В., Антонов С. А., Маслов И. А., Китов М. В., Рудяк К. Б., Лейметер Т. Д. Технология производства экологически безопасных масел-пластификаторов // Нефтехимия. 2017. Т. 57. N 6. С. 726–736. <https://doi.org/10.7868/S0028242117060168>.
5. Tonkonogov B. P., Bagdasarov L. N., Kozhevnikov D. A., Karimova A. F. Separation of solvent extracts using liquid propane to obtain petroleum plasticizers // Chemistry and Technology of Fuels and Oils. 2013. Vol. 49, no. 5. P. 369–374. <https://doi.org/10.1007/s10553-013-0456-2>.
6. Флисюк О. М., Константинов В. А., Лихачёв И. Г., Борисова Е. И. Экстракционная очистка масел-пластификаторов // Модернизация и инновационное развитие топливно-энергетического комплекса: материалы III Междунар. науч.-практ. конф. (Санкт-Петербург, 09 октября 2020 г.). СПб.: Изд-во НИЦ «МашиноСтроение», 2020. С. 29–31. <https://doi.org/10.26160/2618-8953-2019-3-29-31>.
7. Гольдберг О. Д. Контроль производства масел и парафинов. Л.-М.: Химия, 1964. 248 с.
8. Грушова Е. И., Бондарук О. Н., Талерко Е. С. Исследование влияния активирующих добавок на экстракционные свойства фенола // Труды БГТУ. Серия IV. Химия и технология органических веществ. 2001. Т. 1, N 4. С. 73–76.
9. Глебовская Е. А. Применение инфракрасной спектроскопии в нефтяной геохимии. Л.: Недра, 1971. 140 с.
10. Garmarudi A. B., Khanmohammadi M., Fard H. G., de la Guardia M. Origin based classification of crude oils by infrared spectrometry and chemometrics //

Fuel. 2019. Vol. 236. P. 1093–1099. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.09.013>.

11. Guiliano M., Mille G., Kister J., Muller J. F. Etude des specters IRTF de charbons francais de mineralises et de leurs maceraux // Journal of Chemical Physics. 1988. Vol. 85. P. 963–970. <https://doi.org/10.1051/jcp/1988850963>.

12. Berthold P., Staude B., Bernhard U. IR-spektrometrische strukturgruppe analyse aromaten baltiger mineralölprodukte // Schmierungstechnik. 1976. N. 7. P. 280–283.

13. Сафиева Р. З., Кошелев В. Н., Иванова Л. В. ИК-спектметрия в анализе нефти и нефтепродуктов // Вестник Башкирского государственного университета. 2008. Т. 13, N 4. С. 869–874.

14. Агаев С. Г., Землянский Е. О., Гултыев С. В. Парафиновые отложения Верхнесалатского месторождения нефти Томской области // Нефтепереработка и нефтехимия. Научно-технические достижения и передовой опыт. 2006. N 3. С. 8–12.

15. Koshelev V. N., Gordadze G. N., Ryabov V. D., Chernova O. B. Transformations of crude oils in in-situ combustion and prolonged contact with the environment // Chemistry and Technology of Fuels and Oils. 2005. Vol. 41, no. 2. P. 104–107. <https://doi.org/10.1007/s10553-005-0030-7>.

16. Парфенова П. М., Косякова Л. С., Артемьев В. Ю., Григорьев Е. Б., Шафиев И. М. Физико-химическая характеристика конденсатов Чаяндынского нефтегазоконденсатного месторождения // Вести газовой науки: сб. науч. ст. 2012. N 3 (11). Актуальные вопросы исследований пластовых систем месторождений углеводородов. С. 20–35.

17. Савельев В. В., Саидбеков И. Ч., Сурков В. Г., Головкин А. К., Мракин А. Н. Структура смол и асфальтенов жидких продуктов термолитического разложения органического вещества разного типа // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. N 12. С. 1597–1600.

18. Грушова Е. И., Юсевич А. И. Применение добавок химических соединений для интенсификации процессов экстракции, флотации, адсорбции: монография. Минск: Из-во БГТУ, 2006. 172 с.

19. Казакова Л. П., Крейн С. Э. Физико-химические основы производства нефтяных масел. М.: Химия, 1978. 320 с.

20. Проблемы совершенствования технологии производства и улучшения качества нефтяных масел: сб. тр.; под ред. Е. Н. Заяшниковой М.: Нефть и газ, 1996. 198 с.

REFERENCES

1. Shalashova A. A., Novoselov A. S., Lazarev M. A., Shchepalov A. A. Some parameters of refined products and plasticizer oils for automobile tires after purification from carcinogenically dangerous components by using propylene carbonate as an extractant of raw material mixtures. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta = Herald of technological university*. 2017;20(20):64–66. (In Russian).

2. Shalashova A. A., Semenycheva L. L., Novoselov A. S., Lazarev M. A., Shchepalov A. A. Alkylation of oil extracted heavy fraction by some substrates to decrease the content of dangerous PAH. *Vestnik Yuzhno-Ural'skogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya = Bulletin of the South Ural State University. Series Chemistry*. 2019;11(1):42–49 (In Russian).

3. Antonova S. A., Tonkonogov B. P., Kislyakova A. Yu., Dorogochinskaya V. A. Production technologies of various types of environmentally friendly plasticizer oils. *Chemistry and technology of fuels and oils*. 2020;56(3):373–389. <https://doi.org/10.1007/s10553-020-01148-0>.

4. Zagladova S. V., Antonov S. A., Maslov I. A., Kitov M. V., Rudjak K. B., Lejmeter T. D. Technology of production of environmentally friendly plasticizer oils. *Neftekhimiya = Petroleum Chemistry*. 2017;57(6):726–736. <https://doi.org/10.7868/S0028242117060168>. (In Russian).

5. Tonkonogov B. P., Bagdasarov L. N., Kozhevnikov D. A., Karimova A. F. Separation of solvent extracts using liquid propane to obtain petroleum plasticizers. *Chemistry and Technology of Fuels*

and Oils. 2013;49(5):369–374. <https://doi.org/10.1007/s10553-013-0456-2>.

6. Flisyuk O. M., Konstantinov V. A., Likhachev I. G., Borisova E. I. Purification of plasticizer oils by extraction. In: *Modernizatsiya i innovatsionnoe razvitiye toplivno-energeticheskogo kompleksa: materialy III Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii = Modernization and innovative development of the fuel and energy complex: Proceedings of III International Scientific and Practical Conference*. 09 October 2020, St. Petersburg. SPb.: NITs "MashinoStroenie"; 2020, p. 29–31. (In Russian).

7. Gol'dberg O. D. *Control of the production of oils and paraffins*. Leningrad-Moscow: Khimiya; 1964. 248 p. (In Russian).

8. Grushova E. I., Bondaruk O. N., Talerko E. S. Investigation of the effect of activating additives on the extraction properties of phenol. *Trudy BGTU. Seriya IV. Khimiya i tekhnologiya organicheskikh veshchestv = Proceedings of BSTU. Series IV. Chemistry and Technology of organic substances*. 2001;1(4):73–76. (In Russian).

9. Glebovskaya E. A. *Application of infrared spectroscopy in petroleum geochemistry*. Leningrad: Nedra; 1971. 140 p. (In Russian).

10. Gamarudi A. B., Khanmohammadi M., Fard H. G., de la Guardia M. Origin based classification of crude oils by infrared spectrometry and chemometrics. *Fuel*. 2019;236:1093–1099. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.09.013>.

11. Guiliano M., Mille G., Kister J., Muller J. F. Etude des specters IRTF de charbons francais de-

mineralises et de leurs maceraux. *Journal of Chemical Physics*. 1988;85:963–970. <https://doi.org/10.1051/jcp/1988850963>.

12. Berthold P., Staude B., Bernhard U. IR-spektrometrische strukturgruppe analyse aromaten baltiger mineralölprodukte. *Schmier-ungstechnik*. 1976;7:280–283. (In Deutsch).

13. Safieva R. Z., Koshelev V. N., Ivanova L. V. IR spectrometry in the analysis of oil and petroleum products. *Vestnik Bashkirskogo universiteta = Bulletin of Bashkir University*. 2008;13(4):869–874. (In Russian).

14. Agayev S. G., Zemlyanskiy Ye. O., Gul'tya-yev S. V. Paraffin layers of the Verkhnesalatskoye oil field of Tomsk area. *Neftepererabotka i neftekhimiya. Nauchno-tehnicheskie dostizheniya i peredovoi opyt*. 2006;3:8–12 (In Russian).

15. Koshelev V. N., Gordadze G. N., Ryabov V. D., Chernova O. B. Transformations of crude oils in in-situ combustion and prolonged contact with the environment. *Chemistry and Technology of Fuels and Oils*. 2005;41(2):104–107. <https://doi.org/10.1007/s10553-005-0030-7>.

16. Parfenova P. M., Kosyakova L. S., Artem'ev V. Yu.,

Grigor'ev E. B., Shafiev I. M. Physico-chemical characteristics of condensates of the Chayandinsky oil and gas condensate field. *Vesti gazovoy nauki*. 2012;3:20–35 (In Russian).

17. Savelyev V. V., Saidbekov I. C., Surkov V. G., Golovko A. K., Mrakin A. N. The structure of resins and asphaltenes liquid products thermolysis ozonized organic matter of different type. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2015;12:1597–1600. (In Russian).

18. Grushova E. I., Yusevich A. I. *The use of additives of chemical compounds for the intensification of extraction, flotation, and adsorption processes*. Minsk: Izdatel'stvo Belorusskogo gosudarstven-nogo tekhnologicheskogo universiteta; 2006. 172 p. (In Russian).

19. Kazakova L. P., Krein S. E. *Physico-chemical fundamentals of petroleum oils production*. Moscow: Khimiya; 1978. 320 p. (In Russian).

20. Zayashnikov E. N. (ed.) *Improving production technology and quality of petroleum oils*. Moscow: Neft' i Gaz; 1996. 198 p. (In Russian).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

В. И. Жолнеркевич,

магистрант,
Белорусский государственный
технологический университет,
220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а,
Беларусь,
zholnerkevichv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4525-9617>

Е. И. Грушова,

д.т.н., профессор,
Белорусский государственный
технологический университет,
220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а,
Беларусь,
e.grushova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7405-056x>

Вклад авторов

Оба автора сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

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

Информация о статье

Поступила в редакцию 29.10.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Veronika I. Zholnerkevich,

Master's student of the
Belarusian State Technological University,
13a, Sverdlov St., Minsk, 220006,
Belarus,
zholnerkevichv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4525-9617>

Evgeniya I. Grushova,

Dr. Sci. (Engineering),
Belarusian State Technological University,
13a, Sverdlov St., Minsk, 220006,
Belarus,
e.grushova@mail.ru .
<https://orcid.org/0000-0001-7405-056x>

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.*

Information about the article

The article was submitted 29.10.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.

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 11 N 4 (39) 2021

12+

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
Volume 11 No. 4 2021

Редактор О.А. Терновская
Перевод на английский язык: Thomas A. Beavitt, Anastasia Stošić,
Н.Г. Попова, Е.А. Привалова
Компьютерный набор и верстка А.В. Куртовой
Ответственный за выпуск Ю.Н. Пожидаев

Дата выхода в свет 30.12.2021. Формат 60 x 90 / 8.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 23.
Тираж 500 экз. Зак. 197. Поз. плана 5н.

Отпечатано в типографии издательства
ФГБОУ ВО «Иркутский национальный
исследовательский технический университет»
Адрес типографии:
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 81/12А

Издание распространяется бесплатно
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83