МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия и биотехнология

Том 13 N 3 (46) 2023

ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского
технического университета

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия и биотехнология
Том 13 N 3 (46) 2023

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор:

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

Члены редакционной колегии:

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

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

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

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

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

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

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

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

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)

Рахимнеджад Мостафа доктор наук, профессор кафедры химической инженерии Технологического университета Бабола Ноширвани (Бабол, Иран)

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 Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Иркутский национальный исследовательский технический университет»
Подписной индекс в ООО «Урал-Пресс» – 41903
Адрес ООО «Урал-Пресс»: 620026, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Мамина- Сибиряка, д.130
Адрес учредителя и издателя:
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83
Адрес редакции:
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83, ауд. Е-211
E-mail: biochem@istu.edu

© ФГБОУ ВО «ИРНИТУ», 2023

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
IZVESTIYA VUZOV.
Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya
Volume 13 N 3 (46) 2023

EDITORIAL BOARD

Editor in Chief :

Sergei N. Evstaf'ev	Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Irkutsk National Research Technical University, Head of Chemistry and Biotechnology 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)
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)
Mostafa Rahimnejad	Ph.D. in Biotechnology-Chemical Engineering, Professor of chemical engineering department, Babol Noshirvani University of Technology (Babol, Iran)
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. Chkhenkeli	Dr. Sci.(Biology), Professor, Irkutsk State Agricultural University, Head of Anatomy, Physiology and Microbiology Department (Irkutsk, Russia)
Yanming Shen	Professor, Vice-Dean of Department of Chemical Engineering, Shenyang Institute of Chemical Technology (Shenyang, China)

Executive Secretary:

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

The journal was founded in 2011. The journal is issued 4 times a year.
The journal is registered with the Federal Agency for Supervision of Communications,
Information Technologies and Mass Media.
Certificate of registration FS 77-62814 of 18 August, 2015
The journal is included in Ulrich's Periodicals Directory Founder and Publisher:
the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education
Irkutsk National Research Technical University
The subscription code in Ural-Press LLC: 41903
The postal address of Ural-Press LLC: 130 Mamin-Sibiryak st.,
Yekaterinburg 620026, Russia
Address of the founder and publisher:
83 Lermontov St., Irkutsk 664074, Russian Federation
Editorial address:
E-211, 83 Lermontov St., Irkutsk 664074, Russian Federation,
E-mail: biochem@istu.edu

© of FGBOU VO "INRTU", 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Чайка А.А., Шаглаева Н.С., Боженков Г.В., Баяндин В.В., Рудякова Е.В., Иванов Ю.Н. Синтез полиэфиримидов серии Ultem 326

Вахабова В.Э., Гулиев К.Г. Синтез *п*-аминопиридинметакрилата, его гомополимеризация и свойства . 334

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Минаков Д.В., Уразова Я.В., Базарнова Н.Г., Тихонов С.Л., Минакова М.В. Исследование ферментативной активности экстрактов из биомассы высших грибов для получения молочнокислых продуктов 341

Маркова О.В., Гарипова С.Р., Пусенкова Л.И. Сорт-штаммовая специфичность взаимодействия *Bacillus subtilis* с растениями *Phaseolus vulgaris* L. при солевом стрессе 351

Максимова Ю.Г., Пьянкова Е.В., Елисеева А.Д., Щетко В.А., Максимов А.Ю. Каталитические свойства и иммобилизация ферментных препаратов, содержащих липазу галоалкалотолерантных бактерий *Pseudomonas peli* и *Bacillus aequororis* 360

Саксонов М.Н., Жданова Г.О., Стом Д.И., Алферов С.В., Купчинский А.Б., Петрова Ю.Ю., Сасим С.А., Толстой М.Ю., Стом А.Д., Чеснокова А.Н., Кукшинов Б.В. Эффекты анионактивного поверхностно-активного вещества додецилсульфата натрия на адгезию клеток штамма *Micrococcus luteus* 1-и на поверхности углеродных материалов 371

Чхенкели В.А., Чхенкели Г.Д., Никонова А.А., Горшков А.Г. Анализ состава жирных кислот, летучих полярных и неполярных органических соединений ветеринарного препарата «Траметин Плюс» 383

Корчагина А.А. Синтез нитратов целлюлозы из целлюлозы мискантуса гигантского сорта Камис, полученной в условиях опытно-промышленного производства 393

Семенова М.В., Куклина А.Г., Кондратьева В.В., Олехнович Л.С., Воронкова Т.В. Содержание каротиноидов в плодах абрикоса *Prunus armeniaca* L. в зависимости от способа извлечения 403

Семёнов А.А., Еникеев А.Г. Культура клеток *Scorzonera hispanica* L., штамм СФР-SH1. Основные вторичные метаболиты 410

Табакаева О.В., Табакаев А.В. Сверхкритический экстракт из бурой водоросли Японского моря *Undaria pinnatifida* как источник биологически активных веществ 417

Бондаренко О.Н., Тимкин П.Д., Иваченко Л.Е., Блинова А.А., Пензин А.А. К вопросу о микросателлитных ассоциациях культурной сои Амурской области с сельскохозяйственными признаками 426

Горбылева Е.Л., Сафонова М.А., Степанов А.В., Рихванов Е.Г. Повышение устойчивости культуры клеток *Arabidopsis thaliana* к фториду натрия за счет конститутивной экспрессии HSP101 435

Киргизова И.В., Калашникова Е.А., Гаджимурадова А.М., Силаев Д.В., Турпанова Р.М., Жангазин С.Б. Изучение активности антиоксидантных ферментов у сомаклональных вариантов картофеля для использования в селекционном отборе на устойчивость к вирусу PVS 443

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Зубков И.Н., Высочинская В.В., Кашина А.В., Шишлянников С.М. Получение наночастиц mcl-полигидроксиалканоатов, стабилизированных неионогенным детергентом Tween 80 455

CONTENTS

CHEMICAL SCIENCES

Chayka A.A., Shaglaeva N.S., Bozhenkov G.V., Bayandin V.V., Rudyakova E.V., Ivanov Yu.N. Synthesis of the Ultem series polyetherimides 326

Vakhabova V.E., Guliev K.G. Synthesis, homopolymerization and properties of *p*-aminopyridine methacrylate 334

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Minakov D.V., Urazova Ya.V., Bazarnova N.G., Tikhonov S.L., Minakova M.V. Enzymatic activity of extracts from higher fungi for manufacturing fermented dairy products 341

Markova O.V., Garipova S.R., Pusenkova L.I. Variety-strain interaction specificity of *Bacillus subtilis* with salt-stressed *Phaseolus vulgaris* L. plants 351

Maksimova Yu.G., Pyankova E.V., Eliseeva A.D., Shchetko V.A., Maksimov A.Yu. Catalytic properties and immobilization of enzyme preparations containing lipase of the haloalkalotolerant bacteria *Pseudomonas peli* and *Bacillus aequororis* 360

Saksonov M.N., Zhdanova G.O., Stom D.I., Alferov S.V., Kupchinsky A.B., Petrova Yu.Yu., Sasim S.A., Tolstoy M.Yu., Stom A.D., Chesnokova A.N., Kukshinov B.V. Effects of the anionactive surfactant sodium dodecyl sulfate on the adhesion of cells of the strain *Micrococcus luteus* 1-i to the surface of carbon materials 371

Chkhenkeli V.A., Chkhenkeli G.D., Nikonova A.A., Gorshkov A.G. Determining the fatty acids, polar and non-polar volatile organic compounds of the veterinary preparation “Trametin Plus” 383

Korchagina A.A. Synthesis of cellulose nitrates from *Miscanthus* × *giganteus* var. KAMIS cellulose obtained under pilot production conditions 393

Semenova M.V., Kuklina A.G., Kondratieva V.V., Olekhnovich L.S., Voronkova T.V. Carotenoid content in *Prunus armeniaca* L. apricot fruits depending on the extraction method 403

Semenov A.A., Enikeev A.G. Cell culture of *Scorzonera hispanica* L., strain SFR-SH1. Major secondary metabolites 410

Tabakaeva O.V., Tabakaev A.V. Supercritical extract from the Japanese sea brown algae *Undaria pinnatifida* as a source of bioactive compounds 417

Bondarenko O.N., Timkin P.D., Ivachenko L.E., Blinova A.A., Penzin A.A. To the question of microsatellite associations of cultivated soybean of the Amur Oblast with agricultural traits 426

Gorbyleva E.L., Safonova M.A., Stepanov A.V., Rikhvanov E.G. Increased *Arabidopsis thaliana* cell culture resistance to sodium fluoride by constitutive expression of HSP101 435

Kirgizova I.V., Kalashnikova E.A., Gadzhimyradova A.M., Silaev D.V., Turpanova R.M., Zhangazin S.B. Study of the activity of antioxidant enzymes in somaclonal potato variants for use in selection for resistance to the PVS virus 443

BRIEF COMMUNICATION

Zubkov I.N., Vysochinskaya V.V., Kashina A.V., Shishlyannikov S.M. Preparation of mcl-polyhydroxyalkanoate nanoparticles stabilized by the Tween 80 nonionic surfactant. 455

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Обзорная статья
УДК 541.64
EDN: TAGABT
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-325-332

Синтез полиэфиримидов серии Ultem

А.А. Чайка✉, Н.С. Шаглаева, Г.В. Боженков, В.В. Баяндин, Е.В. Рудякова, Ю.Н. Иванов

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

Аннотация. *Полиэфиримиды представляют собой класс конструкционных полимеров с наиболее удачным сочетанием таких важных для практического применения свойств, как высокие тепло- и термостойкость, прочность при разрыве и модуль упругости, хорошие диэлектрические свойства, высокая химическая и радиационная стойкость. Однако наряду с этими достоинствами полиэфиримидам присущ важный недостаток – трудность переработки этих полимеров в изделия, обусловленная их высокими температурами размягчения и плавления. В последние десятилетия найдены способы снижения температуры стеклования путем увеличения гибкости основной полимерной цепи. Для этих целей в основную полимерную цепь вводят химические группы с более высокой степенью вращения, например, изопропилиденовые, гексафторизопропилиденовые, 1,2-дихлорэтиленовые и др. Полиэфиримид, исходными веществами для которого являются 3(4)-нитрофталевый ангидрид, м-фенилендиамин и бисфенол А, впервые выпущен фирмой General Elerctric под маркой Ultem и является на данный момент одним из лучших известных инженерных термопластов. Известны два метода получения таких полиэфиримидов: циклизация полиамидокислоты, которую получают поликонденсацией диангидрида 2,2-бис-[4-(3,4-дикарбоксифенокси)фенил]пропана и мета-фенилендиамина, и реакция полинитрозамещения 1,3-бис[N-(3-нитрофталимидо)]бензола и динатриевой соли бисфенола А. На сегодняшний день в отечественной научной литературе отсутствуют обзоры с подробным описанием известных методов получения полиэфиримидов серии Ultem. В настоящем обзоре обобщены и систематизированы известные литературные данные в области синтеза полиэфиримидов серии Ultem. Описаны способы получения растворимых термопластичных полиэфиримидов серии Ultem, приведены доступные методы синтеза исходных мономеров с указанием выходов продуктов реакции и их физических характеристик.*

Ключевые слова: *полиэфиримид, поликонденсация, полинитрозамещение, циклизация, растворимость, температура стеклования*

Финансирование. *Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Приоритет-2030» ФГБОУ ВО «ИРНИТУ» в рамках стратегического проекта «i.DIT» (Байкальский центр цифровых производственных технологий).*

Для цитирования: Чайка А.А., Шаглаева Н.С., Боженков Г.В., Баяндин В.В., Рудякова Е.В., Иванов Ю.Н. Синтез полиэфиримидов серии Ultem // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 325–332. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-325-332. EDN: TAGABT.

CHEMICAL SCIENCES

Review article

Synthesis of the Ultem series polyetherimides

Anna A. Chayka✉, Nina S. Shaglaeva, Georgy V. Bozhenkov, Victor V. Bayandin,

Elena V. Rudyakova, Yury N. Ivanov

Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. *Polyetherimides (PEIs) are a class of structural polymers with the most successful combination of such essential properties for practical applications as high heat resistance, thermal stability, ultimate tensile strength, elastic modulus, good dielectric properties, and high chemical and radiation resistance. However, along with these advantages, PEIs are compounds with high softening and melting points, which complicates their processing into products. In recent decades, specialists have found numerous ways to decrease the glass transition temperature by increasing the flexibility of the main polymer chain. To this end, functional groups with a higher degree of rotation, such as isopropylidene, hexafluoroisopropylidene, 1,2-dichloroethylene, and other substituents, are introduced into the main polymer chain. Polyetherimide, whose precursors are 3(4)-nitrophthalic anhydride, m-phenylenediamine, and bisphenol A, was first produced by General Electric under the Ultem brand name and is currently believed to be one of the best-known engineering thermoplastics. In particular, two synthetic methods can be used to obtain such polyetherimides. The first technique uses a cyclization of poly(amidocarboxylic acid), which is obtained by the*

© Чайка А.А., Шаглаева Н.С., Боженков Г.В., Баяндин В.В., Рудякова Е.В., Иванов Ю.Н., 2023

polycondensation of dianhydride of 2,2-bis-[4-(3,4-dicarboxyphenoxy)phenyl]propane and m-phenylenediamine. The second technique uses the polynitro substitution of 1,3-bis[N-(3-nitrophthalimido)]benzene and the dynatrium salt of bisphenol A. To date, the Russian scientific literature lacks reviews with detailed descriptions of known methods for the preparation of Ultem series polyetherimides. The present review generalizes and systematizes the available literature data regarding the synthesis of the Ultem series PEIs. In addition, this study describes preparation methods of soluble thermoplastic polyetherimides of this series, available synthesis methods of initial monomers with reaction yields, and physical characteristics of such polymers.

Keywords: *Polyetherimide, polycondensation, polynitro substitution, cyclization, solubility, glass transition temperature*

Funding. *The work was financially supported by the "Priority-2030" program of Irkutsk National Research University within the framework of the independent project "i.DIT" (Baikal Center for Digital Production Technologies).*

For citation: Chayka A.A., Shaglaeva N.S., Bozhenkov G.V., Bayandin V.V., Rudyakova E.V., Ivanov Yu.N. Synthesis of the Ultem series polyetherimides. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(3):325-332. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-325-332. EDN: TAGABT.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время особенно актуальной становится проблема создания отечественных суперконструкционных полиэфирных материалов на основе полиэфиркетонов, полиэфирсульфонов, полиариленэфиркетонов, полиэфиримидов, обладающих такими перспективными свойствами, как высокая термостойкость, огнестойкость, прочность, электропроводность, люминесцентная активность и т.д. [1–4]. Одним из главных представителей этого класса полиэфиров являются полиэфиримиды серии Ultem, производство которых осуществляется крупнейшей компанией в Саудовской Аравии [5]. Этот полимер, благодаря наличию сразу трех шарнирных групп в повторяющемся элементарном звене, размягчается и может перерабатываться всеми стандартными методами в зависимости от дальнейших целей.

Полиэфиримиды серии Ultem имеют низкое дымовыделение при контакте с открытым пламенем, очень высокую прочность, наивысшую температурную стойкость, химическую устойчивость, высокую жесткость и твердость, высокую погодоустойчивость, стойкость к γ-лучам и гидролизу [2, 4].

Полиэфиримиды серии Ultem находят широкое применение в авиационной, аэрокосмической, автомобильной, химической, военной промышленности, машиностроении, станкостроении и в технологии трехмерной 3D-печати. Применение в 3D-печати полиэфиримидов серии Ultem позволяет создавать высокопрочные детали любого размера для разных отраслей промышленности и науки [5–8].

На сегодняшний день в отечественной научной литературе отсутствуют обзоры с описанием известных методов получения полиэфиримидов серии Ultem.

В настоящем обзоре приведены способы получения полиэфиримидов серии Ultem и исходных мономеров для синтеза полимера. Рассмотрены их выходы и физические характеристики. Мы сочли целесообразным рассмотреть наиболее доступные методы получения промежуточных продуктов с указанием их свойств.

Полиэфиримиды серии Ultem получают реакцией ароматического нуклеофильного нитрозамещения 1,3-бис[N-(3-нитрофталимидо)]бензола с динатриевой солью 4,4'-дифенилолпропана [9–11] или взаимодействием диангидридов ароматических тетракарбоновых кислот с *м*-фенилендиамином с последующей циклизацией образующей полиэфирамидокислоты (ПЭАК) [12–16].

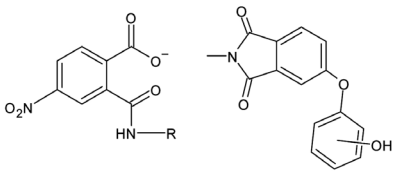
Свойства полиэфиримидов серии Ultem приведены в табл. 1.

СИНТЕЗ ПОЛИЭФИРИМИДОВ СЕРИИ ULTEM РЕАКЦИЕЙ АРОМАТИЧЕСКОГО НУКЛЕОФИЛЬНОГО НИТРОЗАМЕЩЕНИЯ БИС-3(4)-НИТРОФТАЛИМИДА-3,3'-ФЕНИЛДИАМИНА С ДИНАТРИЕВОЙ СОЛЬЮ 4,4'-ДИФЕНИЛОЛПРОПАНА

Реакция ароматического нуклеофильного нитрозамещения в синтезе полиэфиримидов серии Ultem включает процесс замещения активированных ароматических нитрогрупп анионами бисфенола А. В работе установлено, что нитрогруппы, активированные двумя карбонилами, вступают в реакции замещения фенолятными анионами, приводящими к образованию соединений, содержащих шарнирные изопропилиденовые группы [11].

На основании анализа литературных данных по синтезу полиэфиримидов серии Ultem [9–11] реакцией ароматического нуклеофильного нитрозамещения 1,3-бис[N-(3-нитрофталимидо)]бензола с динатриевой солью 4,4'-дифенилолпропана можно заключить, что для получения растворимого термопластичного полимера необходимо строго соблюдать условия процесса.

1. Поликонденсация осуществляется в максимально сухой системе в среде ДМСО или ДМСО/толуол. Даже незначительное количество влаги в реакционной смеси способствует образованию гидроксидных ионов, которые приводят к возникновению в реакционной смеси следующих структур:



Такие структуры не ведут себя как нуклеофилы и тем самым блокируют рост цепи.

В работе [9] установлено, что при добавлении 0,03 и 0,09% воды в реакционную смесь для полимеризации значения характеристической вязкости образующегося полимера составляют 0,25 и 0,18 дл/г соответственно, в то время как в абсолютно сухой системе аналогичное значение для полиэфиримида равно 0,44 дл/г.

Исследование полиэфиримидов серии Ultem с применением гельпроникающей хроматографии (ГПХ) показало, что они характеризуются широким молекулярно-массовым

Таблица 1. Механические и термические свойства полиэфиримидов серии Ultem [10]

Table 1. Mechanical and thermal properties of polyetherimides of the Ultem series [10]

Механические свойства		Термические свойства	
Напряжение в пределе текучести (предел текучести)	105 МПа	Температура стеклования	217 °C
Модуль упругости	3000 МПа	Теплостойкость при нагрузке 1,85 МПа 0,46 МПа	 200 °C 210 °C
Предельное (разрывное) удлинение	60–80%	Кислородный индекс	47
Предел прочности при изгибе	145 МПа	Горючесть по методике UL-94 (вертикальный образец)	V-0 при 0,64 мм
Модуль упругости при изгибе	3300 МПа	Дымовыделение по методике NBS (национальное бюро стандартов) D_s за 4 мин $D_{макс.}$ за 20 мин	 0,7 30
Предел прочности при сжатии	140 МПа	–	–
Модуль упругости при сжатии	2900 МПа	–	–
Прочность при ударе по Гардиеру	36 Н·м	–	–
Ударная вязкость надрезанного образца по Изоду	50 Дж/м	–	–
Ударная вязкость ненадрезанного образца по Изоду	1300 Дж/м	–	–

распределением (ММР), что также может быть связано с присутствием воды в реакционных смесях [9, 10].

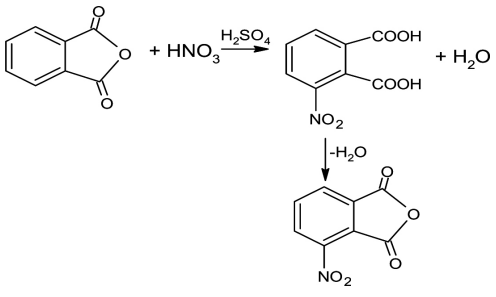
2. Для реакций, протекающих с участием 3,3'-динитрофталимидов, оптимальной температурой является 55 °C. Увеличение температуры и продолжительности реакции приводит к получению более низкомолекулярных полимеров. По-видимому, это объясняется протеканием побочных реакций с нитрит-ионом, выделяющимся в процессе полинитрозамещения.

3. Концентрационный интервал мономеров зависит от скорости растворения мономеров. Авторы работ [9, 10] считают, что оптимальной концентрацией мономеров в смеси растворителей является 20–25%.

4. После завершения процессов синтеза полиэфиримидов в реакционные смеси вводится феноксид натрия или 4-метилфеноксид натрия с целью замещения концевых нитрогрупп и увеличения термостойкости полимеров.

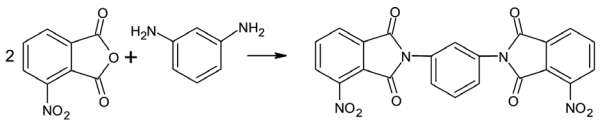
Получение полиэфиримидов серии Ultem реакцией ароматического нуклеофильного нитрозамещения 1,3-бис[N-(3-нитрофталимидо)]бензола с динатриевой солью 4,4'-дифенилолпропана состоит из 4-х стадий.

Стадия 1. Синтез 3-нитрофталевого ангидрида:



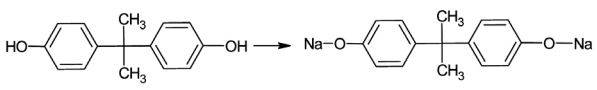
Нитрование фталевого ангидрида проводится дымящей азотной кислотой плотностью 1,51 г/см^3 при температуре 100–110 °C[1]. Выход 3-нитрофталевой кислоты составляет 28–31% от теоретического. Из промывных вод и маточного раствора можно получить 4-нитрофталевый ангидрид. 3-нитрофталевый ангидрид получают из 3-нитрофталевой кислоты нагреванием последней или действием уксусного ангидрида[2]. Выход 3-нитрофталевого ангидрида – 88–93%, $T_{пл}$ = 160–163 °C.

Стадия 2. Синтез 1,3-бис[N-(3-нитрофталимидо)] бензола:



Реакция протекает при температуре около 55 °C в среде уксусной кислоты, выход продукта реакции – 83% [9].

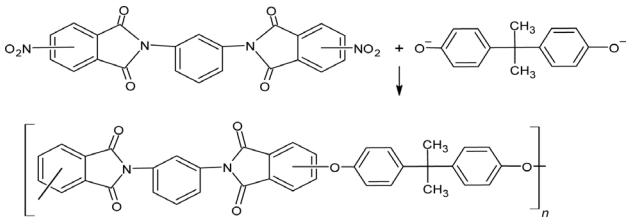
Стадия 3. Получение динатриевой соли 4,4'-дифенилолпропана:



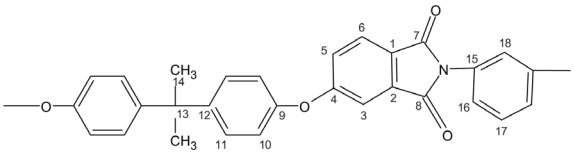
Сухая динатриевая соль 4,4'-дифенилолпропана получена реакцией бисфенола А с водным раствором NaOH с последующим удалением воды при помощи ловушки Дина-Старка или взаимодействием бисфенола А с метилатом натрия [9].

[1]Синтезы органических препаратов: сб. 1. М.: Изд-во Иностранной литературы, 1949. С. 316–317.
[2]Там же. С. 318–319.

Стадия 4. Синтез полиэфиримидов серии Ultem:



В статье [9] приведена подробная методика получения полимера и показано, что при добавлении динатриевой соли 4,4'-дифенилолпропана к 1,3-бис[N-(3-нитрофталимидо)]бензолу при температуре 55 °С в среде толуол/ДМСО реакционная смесь приобретает яркий вишнево-красный цвет, который сохраняется на протяжении всей реакции. Через 5 ч после начала реакции вводили в смесь 4-метилфеноксид натрия для удаления непрореагировавших нитрогрупп. Полимер выделяли осаждением реакционной смеси в метанол. Выход полимера, который представляет собой светло-коричневый порошок, составил 87%. Характеристическая вязкость ([η]), определенная в $CHCl_3$ при температуре 25 °С, равна 0,23 дл/г. Температура стеклования (Tg) = 227 °С. В этой же статье [9] приведены данные гель-проникающей хроматографии (ГПХ): M_w = 21000, M_n = 4130, M_w/M_n = 5,09 и установлено, что на хроматограмме присутствуют два низкомолекулярных пика слабой интенсивности, которые, по мнению авторов, относятся к циклическому мономеру и димеру. Структура полученного полиэфиримида Ultem доказана методом ЯМР (^{13}C) спектроскопии: C(1) – 133,9; C(2) – 118,8; C(3) – 155,1; C(4) – 123,1; C(5) – 136,1; C(6) – 117,7; C(7) – 166,5; C(8) – 164,9; C(9) – 152,9; C(10) – 119,6; C(11) – 128,4; C(12) – 147,2; C(13) – 42,6; C(14) – 31,0; C(15) – 132,3; C(16) – 125,1; C(17) – 129,1; C(18) – 123,5.



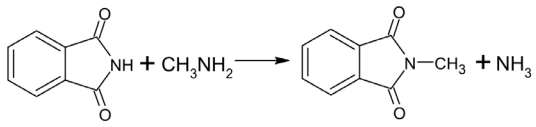
В статье [17] получен полиэфиримид серии Ultem в расплаве при температуре 160–180 °С. Свойства полученного полимера приведены в табл. 2.

Полимер хорошо растворяется в N-метилпирролидоне, ДМФА, ДМАА, CH_3Cl, CH_2Cl_2, частично в ДМСО. По мнению авторов статьи [17], свобода вращения вокруг эфирной связи для 3-изомера частично ограничивается стерическим эффектом *орто*-углеродного заместителя, и поэтому полимер обладает более высокими значениями Tg. При температуре 446 и 460 °С для 3-изомера и 4-изомера наблюдается однопроцентная потеря массы полимера.

СИНТЕЗ ПОЛИЭФИРИМИДА СЕРИИ ULTEM РЕАКЦИЕЙ ДИАНГИДРИДОВ АРОМАТИЧЕСКИХ ТЕТРАКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ С М-ФЕНИЛЕНДИАМИНОМ С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ЦИКЛИЗАЦИЕЙ ПОЛИЭФИРАМИДОКИСЛОТЫ

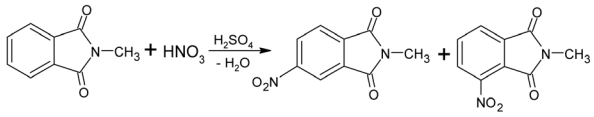
Синтез полиэфиримида серии Ultem по данному способу состоит из 7 стадий.

Стадия 1. Синтез N-метилфталимида:



Подробная методика получения N-метилфталимида приведена в работах [18, 19]. Выход продукта реакции – 93–95%, $T_{пл.}$ = 133–134 °С. Структура N-метилфталимида доказана методами ЯМР- и масс-спектрометрии [18]. ЯМР ^1H (ДМСО-d_6, δ, м.д.): 3,013 (с, CH_3); 7,2–7,9 (м, 4Н) и ^{13}C (ДМСО-d_6, δ, м.д.): 24,11; 123,27; 132,22; 134,63; 168,41. Данные масс-спектрометрии: 38 (13), 50 (20), 76 (68), 104 (100), 148 (25).

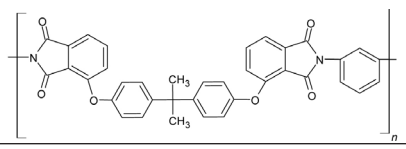
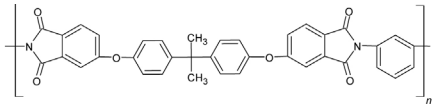
Стадия 2. Синтез N-метил-4-нитрофталимида:



Методика получения N-метил-3(4)-нитрофталимида описана в работах [18, 19]. В патенте [20] показан простой способ разделения изомеров N-метил-4-нитрофталимида и N-метил-3-нитрофталимида. Структура 4-нитрофталимида доказана методом ЯМР (^{13}C). Выход целевого продукта составил 89%, $T_{пл.}$ = 175–178 °С.

Таблица 2. Свойства полиэфиримидов серии Ultem [17]

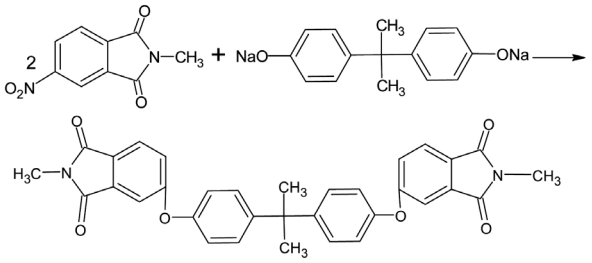
Table 2. Properties of polyetherimides of the Ultem series [17]

Полиэфиримид серии Ultem	Выход полимера, %	[η]*, дл/г	Tg**,°C
	96,8	0,39	236
	98,2	0,50	215

Примечание. *– определена в мета-крезоле при температуре 25 °С; **– определена методом дифференциально-сканирующей калориметрии.

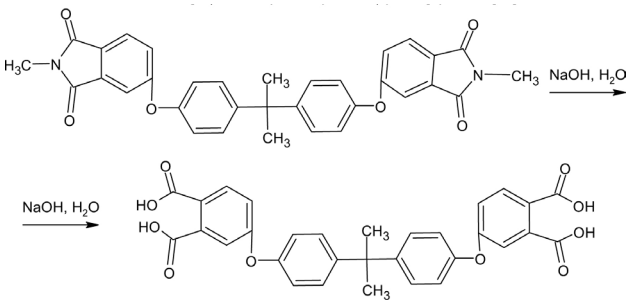
Стадия 3. Сухая динатриевая соль 4,4'-дифенилолпропана получена реакцией бисфенола А с водным раствором NaOH, схема и методика описана выше, но удаление воды осуществляется при помощи ловушки Дина-Старка и затем заменой ловушки с CaH_2 [21].

Стадия 4. Синтез 2,2-бис-[4-(N-фенилфталимид-4-окси)-фенил]пропана:



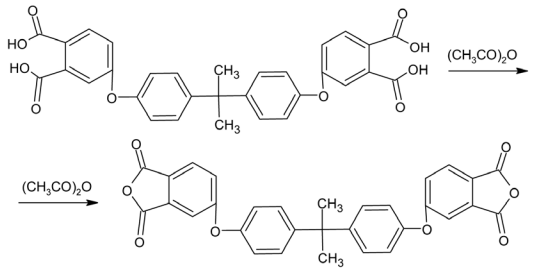
2,2-бис-[4-(N-фенилфталимид-4-окси)-фенил]пропан получен по методике, описанной в статье [15], и представляет собой белоснежные кристаллы с $T_{пл.}$ = 147–149 °С, выход составляет 65–75%. Вычислено, %: С 77,0; Н 4,51. $C_{33}H_{26}N_2O_4$. Найдено, %: 76,7; Н 4,5.

Стадия 5. Синтез 2,2-бис-[4-(3,4-дикарбоксифенокси) фенил]пропана [21]:



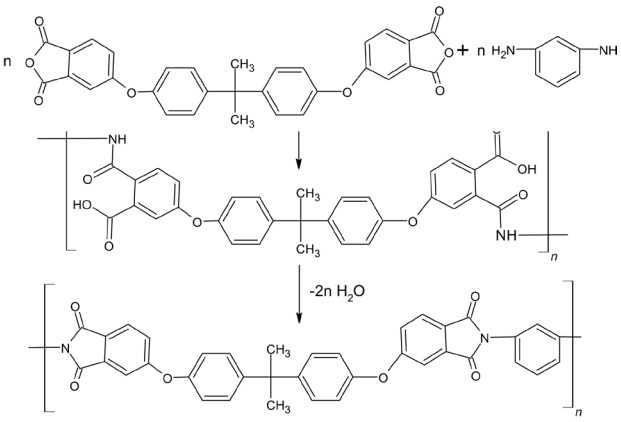
2,2-бис-[4-(3,4-дикарбоксифенокси)фенил]пропан получен по методике, описанной в работе [15]. $T_{пл.}$ = 208–216 °С. Вычислено, %: С 66,9; Н 4,3. $C_{31}H_{24}O_{10}$. Найдено, %: 66,5; Н 4,4.

Стадия 6. Синтез диангидрида 2,2-бис-[4-(3,4-дикарбоксифенокси)фенил]пропана:



В работе [15] приведена подробная методика получения диангидрида 2,2-бис-[4-(3,4-дикарбоксифенокси) фенил]пропана. Выход составил 90–93%, $T_{пл.}$ = 187–190 °С.

Стадия 7. Получение полиэфиримидов серии Ultem:



Авторы работы [15] установили оптимальные условия синтеза ПЭАК в растворе N-метилпирролидона: использование избытка диангидрида в 3 и 5 мол.% и постепенный подъем температуры до 180 °С, время реакции – 5–6 ч. Из разбавленного раствора полимера отлиты пленки и затем осуществлена термическая циклизация ПЭАК. Степень циклизации контролировалась методом ИК-спектроскопии. Все полученные пленки растворялись в амидных и хлорсодержащих органических растворителях (хлороформ, дихлорэтан, хлористый метилен), приведенная вязкость – 0,6–0,4 дл/г. Осуществлен синтез полиэфиримида серии Ultem низкотемпературной поликонденсацией диангидрида 2,2-бис-[4-(3,4-дикарбоксифенокси)фенил]пропана и *мета*-фенилендиамина в растворе N-метилпирролидона с последующей химической циклизацией образующихся ПЭАК в растворе под действием уксусного ангидрида в присутствии третичного амина как катализатора [16]. В работе приведены следующие характеристики полиэфиримида: [η] = 0,67 дл/г, Tg = 220 °С, $T_{тек.}$ = 280 °С.

Исследование циклизации ПЭАК по ступенчатому температурно-временному режиму или химическим путем в растворах уксусного ангидрида и пиридина проведено авторами работ [22, 23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренный выше материал свидетельствует о значительных успехах в области синтеза полиэфиримидов серии Ultem. Подробно рассмотрены методы синтеза полиэфиримидов серии Ultem реакцией полинитрозамещения бис-3-нитрофталимида 3,3'-фенилдиамина с динатриевой солью бисфенола А и циклизацией полиамидокислоты, которую получают поликонденсацией диангидрида 2,2-бис-[4-(3,4-дикарбоксифенокси)фенил] пропана и *мета*-фенилендиамина. Полученный полиэфиримид серии Ultem является одним из лучших инженерных термопластов, известных на сегодняшний день, и широко используется в технологии трехмерной 3D-печати.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Бородулин А.С., Калинников А.Н., Музыка С.С., Терешков А.Г. Полиэфиримиды для создания теплостойких полимерных композиционных материалов с высокими физико-механическими свойствами // Вестник Белгородского государственного технологического университета им. В.Г. Шухова. 2019. N 11. С. 94–100. https://doi.org/10.34031/2071-7318-2019-4-11-94-100. EDN: DNSBVC.

2. Шифрина З.Б., Русанов А.Л. Ароматические полиимиды с гибкими и жесткими цепями // Успехи химии. 1996. Т. 65. N 7. С. 648–658. EDN: MOWEZR.

3. Lin B., Sundararaj U. Visualization of poly(ether imide) and polycarbonate blending in an internal mixer // Journal of Applied Polymer Science. 2004. Vol. 92, no. 2. P. 1165–1175. https://doi.org/10.1002/app.20127.

4. Johnson R.O., Burlhis H.S. Polyetherimide: a new high-performance thermoplastic resin // Journal of Polymer Science: Polymer Symposia. 2007. Vol. 70, no. 1. P. 129–143.
https://doi.org/10.1002/polc.5070700111.

5. Polyakov I.V., Vaganov G.V., Yudin V.E., Smirnova N.V., Ivan'kova E.M., Popova E.N. Study of polyetherimide and its nanocomposite 3D printed samples for biomedical application // Polymer Science. Series A. 2020. Vol. 62, no. 4. P. 337–342.
https://doi.org/10.1134/s0965545x20040094.

6. Cicala G., Ognibene G., Portues S., Blanc I., Rapisarda M., Pergolizzi E., et al. Comparison of Ultem 9085 used in fused deposition modelling (FDM) with polytherimide blends // Materials. 2018. Vol. 11, no. 2. P. 285. https://doi.org/10.3390/ma11020285.

7. Padovano E., Galfione M., Concialdi P., Lucco G., Badini C. Mechanical and thermal behavior of Ultem® 9085 fabricated by fused-deposition modeling // Applied Sciences. 2020. Vol. 10, no. 9. P. 3170.
https://doi.org/10.3390/app10093170.

8. Zaldivar R.J., Witkin D.B., McLouth T., Patel D.N., Schmitt K., Nokes J.P. Influence of processing and orientation print effects on the mechanical and thermal behavior of 3D-printed Ultem® 9085 material // Additive Manufacturing. 2017. Vol. 13. P. 1–32.
https://doi.org/10.1016/j.addma.2016.11.007.

9. White D.M., Takekoshi T., Williams F.J., Relles H.F., Donahue P.E., Klopfer H.J., et al. Polyetherimides via nitro-displacement polymerization: monomer synthesis and ^{13}C-NMR analysis of monomers and polymers // Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition. 1981. Vol. 19, no. 7. P. 1635–1658.
https://doi.org/10.1002/pol.1981.170190705.

10. Takekoshi T. Synthesis of high performance aromatic polymers via nucleophilic nitro displacement reaction // Polymer Journal. 1987. Vol. 19, no. 1. P. 191–202. https://doi.org/10.1295/polymj.19.191.

11. Коршак В.В., Русанов А.Л., Казакова Г.В., Забельников Н.С., Матвелашвили Г.С. Реакция нуклеофильного нитрозамещения в синтезе полиимидов // Высокомолекулярные соединения. 1988. Т. 30. N 9. С. 1795–1814.

12. Русанов А.Л., Такекоши Т. Реакции синтеза ароматических полимеров с использованием нитросодержащих мономеров // Успехи химии. 1991. Т. 60. N 7. С. 738–750.
https://doi.org/10.1070/RC1991v060n07ABEH001106.

13. Johnson D.S., Williams F.J., Scotia N.Y. Preparation of bisphenols-A bisimides. Patent USA, no. 4048190. 1977.

14. Johnson D.S., Scotia N.Y. Method for making aromatic bis(ether dicarboxylic acid)s. Patent USA, no. 4054600. 1977.

15. Жубанов Б.А., Архипова И.А., Шалабаева И.Д., Никитина А.И., Матвеев В.А., Федотов Ю.А. Растворимые термопластичные полиэфиримиды // Высокомолекулярные соединения. 1993. Т. 35. N 2. С. 152–156.

16. Антонов А.В., Кузнецов А.А., Берендяев В.И., Лавров С.В., Гитина Р.М., Котов Б.В. Влияние условий синтеза и испытаний на термическую деструкцию полиэфиримидов // Высокомолекулярные соединения. 1994. Т. 36. N 1. С. 20–25.

17. Takekoshi T., Kochanowski J.E., Manello J.S., Webber M.J. Polyetherimides. II. High-temperature solution polymerization // Journal of Polymer Science: Polymer Symposia. 1986. Vol. 74, no. 1. P. 93–108. https://doi.org/10.1002/polc.5070740111.

18. Крижановская А.И., Антонова М.М., Яковлева В.А., Костикова Н.А., Морозова О.Т. Способ получения N-метил-4-нитрофталимида с использованием 65%-ной азотной кислоты // Химия и технология органических веществ. 2022. Т. 21. N 1. С. 4–11. EDN: DOVTWS.

19. Vasilevskaya T.N., Yakovleva O.D., Kobrin V.S. A convenient method of N-methylphthalimide synthesis // Synthetic Communications. 1995. Vol. 25, no. 16. P. 2463–2465.
https://doi.org/10.1080/00397919508015451.

20. Williams F.J., Scotia N.Y. Process for separating N-methyl-4-nitrophthalimides. Patent USA, no. 3923828. 1974.

21. Пат. N 674677, СССР, C08G 73/16, C08G 73/10. Способ получения полиэфиримидов / Т. Такекоси, Д.Э. Кочановский; заявитель и патентообладатель иностранная фирма «Дженерал Электрик Компани» (США). Заявл. 10.07.1974; опубл. 15.07.1979. Бюл. N 26.

22. Гофман И.В., Мелешко Т.К., Богорад Н.Н., Склизкова В.П., Кудрявцев В.В. Долговременная стабильность физико-механических свойств пленок термостойких полиимидов // Высокомолекулярные соединения. 2004. Т. 46. N 7. С. 1176–1184.

23. Адрова Н.А., Артюхов А.И., Баклагина Ю.Г., Борисова Т.И., Котон М.М., Кувшинский Е.В. [и др.]. Структура и релаксационные свойства полиэфирамидоксилот в процессе их имидизации // Высокомолекулярные соединения. 1972. Т. 14. N 10 С. 2166–2173.

REFERENCES

1. Borodulin A.S., Kalinnikov A.N., Muzyka S.S., Tereshkov A.G. Polyetherimides for creating heat-resistant polymer composite materials with changes in physical and mechanical properties. *Vestnik Belgorodskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta im. V.G. Shukhova = Bulletin of BSTU Named after V.G. Shukhov.* 2019;(11):94-100. (In Russian).
https://doi.org/10.34031/2071-7318-2019-4-11-94-100.
EDN: DNSBVC.

2. Shifrina Z.B., Rusanov A.L. Aromatic polyimides with flexible and rigid-rod chains. *Uspekhi khimii = Russian Chemical Reviews.* 1996;65(7):648-658. (In Russian). EDN: MOWEZR.

3. Lin B., Sundararaj U. Visualization of poly(ether imide) and polycarbonate blending in an internal mixer. *Journal of Applied Polymer Science.* 2004;92(2):1165-1175.
https://doi.org/10.1002/app.20127.

4. Johnson R.O., Burlhis H.S. Polyetherimide: a new high-performance thermoplastic resin. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia.* 2007;70(1):129-143. https://doi.org/10.1002/polc.5070700111.

5. Polyakov I.V., Vaganov G.V., Yudin V.E., Smirnova N.V., Ivan'kova E.M., Popova E.N. Study of polyetherimide and its nanocomposite 3D printed samples for biomedical application. *Polymer Science. Series A.* 2020;62(4):337-342. https://doi.org/10.1134/s0965545x20040094.

6. Cicala G., Ognibene G., Portues S., Blanc I., Rapisarda M., Pergolizzi E., et al. Comparison of Ultem 9085 used in fused deposition modelling (FDM) with polytherimide blends. *Materials.* 2018;11(2):285. https://doi.org/10.3390/ma11020285.

7. Padovano E., Galfione M., Concialdi P., Lucco G., Badini C. Mechanical and thermal behavior of Ultem® 9085 fabricated by fused-deposition modeling. *Applied Sciences.* 2020;10(9):3170. https://doi.org/10.3390/app10093170.

8. Zaldivar R.J., Witkin D.B., McLouth T., Patel D.N., Schmitt K., Nokes J.P. Influence of processing and orientation print effects on the mechanical and thermal behavior of 3D-printed Ultem® 9085 material. *Additive Manufacturing.* 2017;13:1-32. https://doi.org/10.1016/j.addma.2016.11.007.

9. White D.M., Takekoshi T., Williams F.J., Relles H.F., Donahue P.E., Klopfer H.J., et al. Polyetherimides via nitro-displacement polymerization: monomer synthesis and ^{13}C-NMR analysis of monomers and polymers. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition.* 1981;19(7):1635-1658. https://doi.org/10.1002/pol.1981.170190705.

10. Takekoshi T. Synthesis of high performance aromatic polymers via nucleophilic nitro displacement reaction. *Polymer Journal.* 1987;19(1):191-202. https://doi.org/10.1295/polymj.19.191.

11. Korshak V.V., Rusanov A.L., Kazakova G.V., Zabelnikov N.S., Matvelashvili G.S. Nucleophilic nitro substitution reaction in the synthesis of polyimides. *Vysokomolekulyarnye soedineniya = Polymer Science.* 1988;30(9):1795-1814. (In Russian).

12. Rusanov A.L., Takekoshi T. Reactions using nitro-containing monomers for the synthesis of aromatic polymers. *Uspekhi khimii = Russian Chemical Reviews.* 1991;60(7):738-750. (In Russian). https://doi.org/10.1070/RC1991v060n07ABEH001106.

13. Johnson D.S., Williams F.J., Scotia N.Y. *Preparation of bisphenols-A bisimides.* Patent USA, no. 4048190; 1977.

14. Johnson D.S., Scotia N.Y. *Method for making aromatic bis(ether dicarboxylic acid)s.* Patent USA, no. 4054600; 1977.

15. Zhubanov B.A., Arkhipova I.A., Shalabaeva I.D., Nikitina A.I., Matveev V.A., Fedotov Yu.A. Soluble thermoplastic polyetherimides. *Vysokomolekulyarnye soedineniya = Polymer Science.* 1993;35(2):152-156. (In Russian).

16. Antonov A.V., Kuznetsov A.A., Berendyaev V.I., Lavrov S.V., Gitina R.M., Kotov B.V. Thermal degradation of polyetherimides as influenced by the synthetic and testing conditions. *Vysokomolekulyarnye soedineniya = Polymer Science.* 1994;36(1):20-25. (In Russian).

17. Takekoshi T., Kochanowski J.E., Manello J.S., Webber M.J. Polyetherimides. II. High-temperature solution polymerization. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia.* 1986;74(1):93-108. https://doi.org/10.1002/polc.5070740111.

18. Krizhanovskaya A.I., Antonova M.M., Yakovleva V.A., Kostikova N.A., Morozova O.T. Method for producing a-methyl-4-nitrophthalimide using 65% nitric acid. *Khimiya i tekhnologiya organicheskikh veshchestv.* 2022;21(1):4-11. (In Russian). EDN: DOVTWS.

19. Vasilevskaya T.N., Yakovleva O.D., Kobrin V.S. A convenient method of N-methylphthalimide synthesis. *Synthetic Communications.* 1995;25(16):2463-2465. https://doi.org/10.1080/00397919508015451.

20. Williams F.J., Scotia N.Y. *Process for separating N-methyl-4-nitrophthalimides.* Patent USA, no. 3923828; 1974.

21. Takekosi T., Kochanovskij D.E. *Method for producing polyetherimides.* Patent RF, no. 674677; 1979. (In Russian).

22. Gofman I.V., Meleshko T.K., Bogorad N.N., Sklizkova V.P., Kudryavtsev V.V. Long-term stability of physical and mechanical properties of heat-resistant polyimides films. *Vysokomolekulyarnye soedineniya = Polymer Science.* 2004;46(7):1776-1884. (In Russian).

23. Adrova N.A., Artyukhov A.I., Baklagina Yu.G., Borisova T.I., Koton M.M., Kuvshinskii E.V., et al. Structure and relaxation properties of polyetheramidoxylates during their imidization. *Vysokomolekulyarnye soedineniya = Polymer Science.* 1972;14(10):2166-2173. (In Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Чайка Анна Анатольевна,
к.х.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉caa@ex.istu.edu
https://orcid.org/0000-0001-9992-0656

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anna A. Chayka,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University, 83,
Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉caa@ex.istu.edu
https://orcid.org/0000-0001-9992-0656

Шаглаева Нина Савельевна,
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

Боженков Георгий Викторович,
к.х.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
georgiy@bozhenkov.ru
https://orcid.org/0000-0002-8611-9058

Баяндин Виктор Владимирович,
к.х.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

Рудякова Елена Владимировна,
к.х.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
rudlenka@list.ru

Иванов Юрий Николаевич,
к.т.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
iv_yuriy@istu.edu
https://orcid.org/0000-0002-8887-3038

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

Georgy V. Bozhenkov,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University, 83,
Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
georgiy@bozhenkov.ru
https://orcid.org/0000-0002-8611-9058

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

Elena V. Rudyakova,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University, 83,
Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
rudlenka@list.ru

Yury N. Ivanov,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University, 83,
Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
iv_yuriy@istu.edu
https://orcid.org/0000-0002-8887-3038

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.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

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.

Информация о статье

Поступила в редакцию 07.04.2023.
Одобрена после рецензирования 12.06.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

Information about the article

The article was submitted 07.04.2023.
Approved after reviewing 12.06.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Научная статья
УДК 541.64:547.564.4
EDN: BUTVBX
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-333-339

Синтез *п*-аминопиридинметакрилата, его гомополимеризация и свойства

В.Э. Вахабова, К.Г. Гулиев✉

Институт полимерных материалов Министерства науки и образования Азербайджанской Республики, г. Сумгайыт, Азербайджан

Аннотация. *Впервые взаимодействием п-аминопиридина с метакрилоилхлоридом получен п-аминопиридинметакрилат. Методами ИК- и ЯМР-спектроскопии доказана его структура. Проведена радикальная гомополимеризация синтезированного п-аминопиридинметакрилата как в массе, так и в растворе бензола (инициатор – динитрил азобисизомасляной кислоты), изучены закономерности процесса. Исследование радикальной полимеризации п-аминопиридинметакрилата показало, что процесс полимеризации в найденных условиях протекает без образования побочных реакций и индукционного периода с максимальным выходом 92%. Было обнаружено, что п-аминопиридинметакрилат при радикальной полимеризации ведет себя как более активный мономер по сравнению с метилметакрилатом. Структура полученного мономера и полимера исследована методами ИК- и ЯМР-спектроскопии. На основании данных ИК- и ЯМР-спектров установлено, что процесс полимеризации протекает по двойной связи, а заместители остаются незатронутыми в боковой макроцепи. Исследование процесса полимеризации синтезированного мономера в массе показало, что он протекает с автоускорением. Начало автоускорения начинается при ~25%-м превращении мономера в процессе полимеризации, что согласуется с литературными данными. Выявлено, что полимеризация п-аминопиридинметакрилата протекает со скоростью, превосходящей скорость полимеризации метилметакрилата. Вероятно, этот факт связан с влиянием заместителя в мономере на электронное состояние всей молекулы, в результате чего изменяется электронная плотность винильной группы, а растущий радикал стабилизируется с заместителем –М-эффектом. Выявлено, что синтезированный полимер обладает высокими антимикробными свойствами.*

Ключевые слова: *п-аминопиридин, метакрилат, гомополимеризация, антимикробность, метакрилоилхлорид, радикальная полимеризация*

Для цитирования: Вахабова В.Э., Гулиев К.Г. Синтез *п*-аминопиридинметакрилата, его гомополимеризация и свойства // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 333–339. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-333-339. EDN: BUTVBX.

CHEMICAL SCIENCES

Original article

Synthesis, homopolymerization and properties of *p*-aminopyridine methacrylate

Vusala E. Vakhabova, Kazym G. Guliev✉

Institute of Polymer Materials of the Ministry of Science and Education of the Republic of Azerbaijan, Sumgait, Azerbaijan

Abstract. *For the first time, p-aminopyridine methacrylate was synthesized by a reaction between p-aminopyridine and methacryloyl chloride. IR and NMR spectroscopy confirmed the obtained compound structure. Radical homopolymerization of synthesized p-aminopyridine methacrylate was carried out either in bulk or in benzene solution (initiator – AIBN). The study of radical polymerization regularities of p-aminopyridine methacrylate discovered no side reactions and induction period of the reported process under the created conditions with a maximum yield of 92%. It was found that p-aminopyridine methacrylate is a more reactive monomer in radical polymerization as compared to methyl methacrylate. The structure of the obtained monomer and polymer was investigated by IR and NMR spectroscopy. Based on these data, the polymerization proceeds by a double bond, with substituents in the side macro chain remaining unreacted. The study of the synthesized monomer polymerization in the bulk indicated the presence of the gel effect. The autoacceleration begins at ~25% monomer conversion during the polymerization process, which agrees with the literature data. It was discovered that the polymerization of p-aminopyridine methacrylate proceeds at a rate higher than that of methyl methacrylate. This observation is likely to be connected with the substituent contribution to the electronic*

© Вахабова В.Э., Гулиев К.Г.,2023

state of the entire monomer molecule. Hence, the electron density of the vinyl group changes and the growing radical becomes stabilized with the substituent –M-effect. The polymer synthesized possesses high antimicrobial properties.

Keywords: *p-aminopyridine, methacrylate, homopolymerization, antimicrobial properties, methacryloyl chloride, radical polymerization*

For citation: Vakhabova V.E., Guliev K.G. Synthesis, homopolymerization and properties of *p*-aminopyridine methacrylate. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(3):333–339. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-333-339. EDN: BUTVBX.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение устойчивых ко многим бактерицидным веществам штаммов и возможность их эпидемического распространения является серьезной проблемой для построения эффективной антибактериальной терапии. В связи с этим становится необходимым поиск средств, обеспечивающих блокировку сразу нескольких факторов устойчивости патогенных микроорганизмов. Для решения этой задачи перспективным представляется использование синтетических полимеров, которые могут оказывать комбинированное воздействие на бактериальную клетку, а также являются более эффективными и менее опасными для человека по сравнению с низкомолекулярными биоцидными веществами, традиционно используемыми для защиты от микроорганизмов.

Полимеры, содержащие в своем составе функционально активные группы, обладают широким спектром медико-биологической активности и используются в качестве бактерицидов, фунгицидов, лекарственных препаратов. Чаще всего для получения таких полимеров применялись мономеры винилового и акрилового ряда, содержащие в структуре мономера амины, карбонильные и другие создаваемые бактерицидные фрагменты [1–6].

В настоящее время некоторые функциональные полимеры получили широкое применение при создании биоцидных и дезинфицирующих средств, флокулянтов, а также композиционных материалов, поверхность которых обладает бактерицидной и фунгицидной активностью[1] [6–18]. Особо востребованными становятся биоцидные препараты с разной степенью гидрофобности. Цель настоящей работы – исследование синтеза мономера *п*-аминопиридинметакрилата (*п*-АПМА) и изучение его радикальной полимеризации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ИК-спектры полимера записаны на приборе ALPHA ИК-Фурье (Bruker Lumos II, Германия), спектры ЯМР ^{1}H – на спектрометре Bruker HFR-300 (Bruker, Германия) в $CDCl_3$; химические сдвиги определены относительно тетраметилсилана.

Синтез п-АПМА. В колбу с обратным холодильником помещали 0,5 моль (47 г) *п*-аминопиридина в среде третичного амина ($(C_2H_5)_3N$); при температуре 30 °С при перемешивании по каплям добавляли 0,6 моль (62,7 г) метакрилоилхлорида в 30 мл абсолютного серного эфира. После завершения реакции (1 ч) смесь экстрагировали серным эфиром, затем сушили, перегоняли легкие фракции (36,5 °С), а потом основную фракцию в вакууме. Выход составил 92%. $T_{кип.}$=114–116/3 мм рт. ст.; $n_D^{20} = 1{,}4202$; $d_4^{20} = 0{,}936$.

Элементный анализ $C_9H_{10}N_2O$. Вычислено, %: С 66,6; Н 6,17; N 17,28. Найдено, %: С 66,8; Н 6,13; N 17,18.

Синтез поли-п-аминопиридинметакрилата

Методика полимеризации в растворе. Полимеризацию синтезированного мономера осуществляли в запаянных ампулах в атмосфере азота в растворе бензола (около 3 ч). Полимеризационный раствор, содержащий мономер и инициатор (динитрил азобисизомасляной кислоты (ДАК)), помещали в стеклянную ампулу, смесь продували потоком азота в течение 8 мин. Затем ампулу плотно запаивали и помещали в термостат при 343 К. Концентрация мономера составила 2 моль/л, а инициатора – 0,3 моль% от массы мономера. Образовавшийся полимер очищали двукратным переосаждением из бензольного раствора в метанол и сушили при пониженном давлении (15–20 мм рт. ст.) при температуре 30 °С до постоянной массы. Выход составил 93%.

Методика полимеризации в массе. В однокамерную ампулу помещали 2 г *п*-АПМА и 0,006 г ДАК в качестве инициатора. В присутствии азота помещали в термостат при 343 К в течение 2 ч. По завершении реакции ампулу охлаждали, вскрывали, растворяли в бензоле, затем осаждали в метанол и сушили до постоянной массы. Выход составил 95% – 1,9 г.

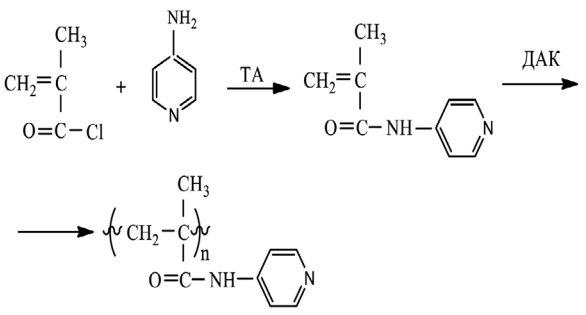
Элементный анализ $C_9H_{10}N_2O$. Вычислено, %: С 66,6; Н 6,17; N 17,28. Найдено, %: С 66,5; Н 6,09; N 17,08.

Характеристическую вязкость полимера ($[\eta]_{масс.}$=0,58, $[\eta]_{раст.}$ = 0,66 дл/г) определяли в бензоле в вискозиметре Уббелоде.

Кинетику гомополимеризации изучали в обычном однокамерном дилатометре емкостью 13,7 мл с ценой деления измерительной бюретки 0,01 мл. Полученный полимер растворяли в хлороформе и осаждали в метанол.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

п-АПМА и его гомополимер были получены по реакции:



Чистота синтезированного соединения контролировалась методом ГЖХ-анализа (рис. 1) и во всех случаях составила 99,5%.

[1] Sivov N.A., Martynenko A.I., Popova N.I. Handbook of Condensed Phase Chemistry. Nova Science Publ. Inc., 2011.

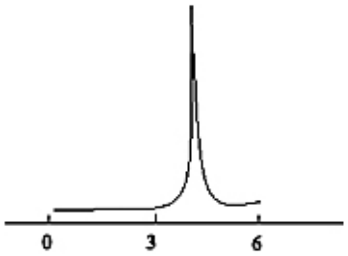


Рис. 1. ГЖХ-анализ *п*-аминопиридинметакрилата

Fig. 1. GLC analysis of *p*-aminopyridine methacrylate

Радикальную полимеризацию проводили в массе и в растворе бензола в запаянных ампулах в атмосфере азота при 343 К в присутствии ДАК.

Выявлено, что реакционная система остается гомогенной вплоть до высоких конверсий (практически до 92%). Синтезированный полимер представляет собой белый порошок, растворимый в ароматических и хлорсодержащих углеводородах, таких как CH_3Cl, CH_2Cl_2, CCl_4, и некоторых полярных растворителях, таких как DMF, DMCO; и нерастворимый в алифатических углеводородах, низших спиртах и диэтиловом эфире. Выявлено, что синтезированный полимер обладает хорошими пленкообразующими, эластичными и другими свойствами.

Структура полученных полимеров исследована методами ИК- и ЯМР-спектроскопии. Путем сопоставления ИК-спектров исходного мономера (рис. 2) и полученного полимера (рис. 3), которому принадлежат полосы поглощения 1720 $см^{-1}$, были обнаружены полосы поглощения, характеризующие валентные колебания карбонильной группы образующихся полимеров при 1730 $см^{-1}$ (см. рис. 3). Смещение максимума полосы поглощения, характеризующей группу C=O, находящуюся у полимера, связано с раскрытием двойной связи, что приводит к нарушению сопряжения и перераспределению электронной плотности в структуре мономера. Для *п*-аминопиридина характерны следующие характеристические полосы поглощения связей: пиридиновый цикл характеризуется группой слабых полос, появляющихся на низкочастотной стороне основной полосы ν(CH) в области 2800–2700 $см^{-1}$; характерные для N–H-фрагмента соответственно в области 3307 и 3436 $см^{-1}$; валентные колебания связи C–N в циклических соединениях в области 1350–1280 $см^{-1}$, вызванные участием C–N в скелетных колебаниях молекулы; симметричные валентные колебания группы CH_2 при 2724 $см^{-1}$; асимметричные и симметричные валентные колебания C–H-группы при 2931 и 2865 $см^{-1}$ соответственно.

Из рис. 3 видно, что полосы поглощения в областях 900–1000, 1635–1640 $см^{-1}$, относящиеся к деформационным и валентным колебаниям двойной связи винильной группы, после полимеризации исчезают.

В ЯМР-спектре протонные сигналы, относящиеся к протонам винильной группы (4,50–5,10 м.д.), отсутствуют в полимерном образце. Остальные резонансные протоны остаются в молекуле полимера незатронутыми.

Результаты спектральных анализов показали, что полимеризация протекает только по двойной связи винильной группы, а аминопиридиновые фрагменты в боковой цепи остаются без изменений.

Для оценки способности синтезированного мономера к полимеризации и выявления ее зависимости от

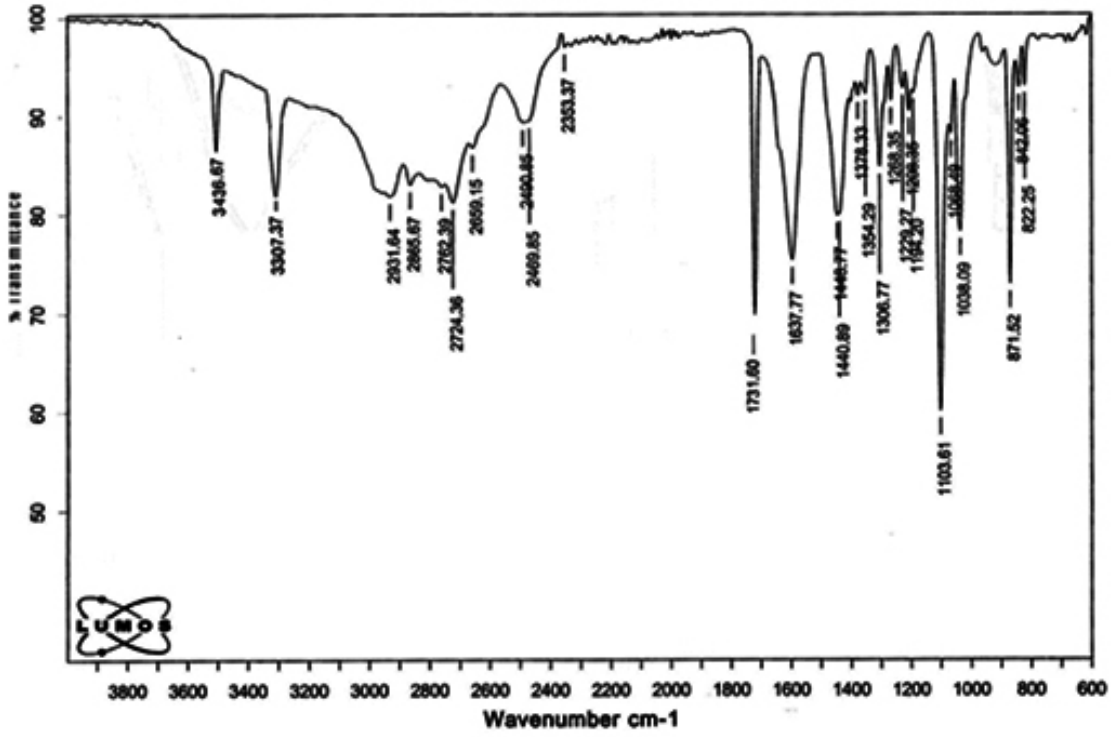


Рис. 2. ИК-спектр *п*-аминопиридинметакрилата

Fig. 2. IR spectrum of *p*-aminopyridine methacrylate

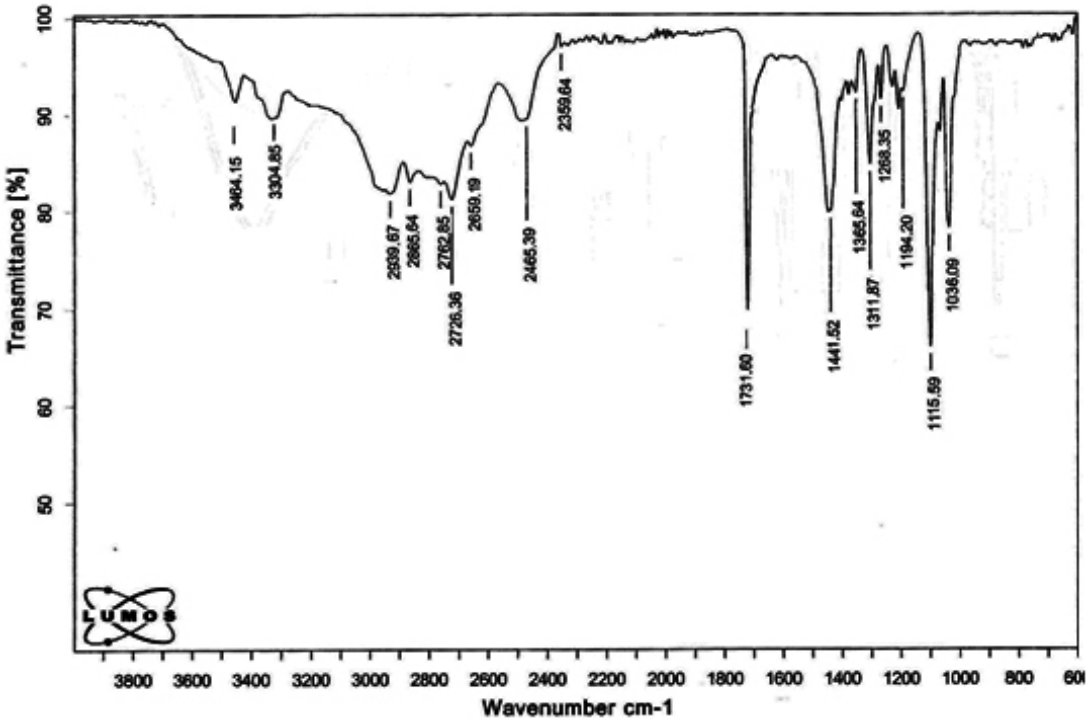


Рис. 3. ИК-спектр поли-*п*-аминопиридинметакрилата

Fig. 3. IR spectrum of poly-*p*-aminopyridine methacrylate

продолжительности полимеризации при выбранных стандартных условиях на рис. 4 представлены полученные кинетические кривые полимеризации синтезированного нами мономера и метилметакрилата. При сопоставлении кинетических кривых видно, что по скорости радикальной полимеризации синтезированный мономер и метилметакрилат различаются между собой: полимеризация *п*-АПМА протекает со скоростью, превосходящей скорость полимеризации метилметакрилата. Такой факт, вероятно, связан с влиянием аминопиридинового фрагмента на винильную группу. Другим важным фактором, влияющим на характер полимеризации, может быть относительная стабильность макрорадикала, ответственного за рост цепи.

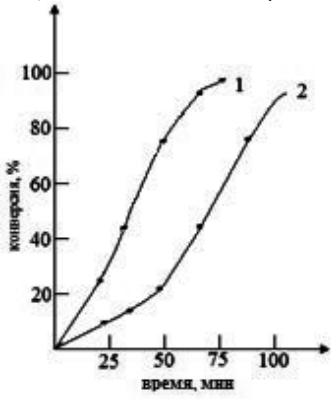


Рис. 4. Зависимость конверсии от продолжительности реакции полимеризации (в массе):
1 – *п*-аминопиридинметакрилат; 2 – метилметакрилат

Fig. 4. Relationship between conversion and polymerization reaction time (in mass): 1 – *p*-aminopyridine methacrylate; 2 – methyl methacrylate

Выявлено, что радикальная полимеризация мономера в массе сопровождается автоускорением. Начало автоускорения начинается при ~25%, что согласуется с работами [19, 20]. Автоускорение радикальной полимеризации *п*-АПМА, вероятно, связано с комплексом структурно-физических переходов полимеризационной системы, обусловливающих изменение характера диффузии растущих полимерных цепей.

Биологические испытания показали достаточно высокую бактерицидную (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus*) и фунгицидную (*Candida albicans*) активность синтезированного полимера. Зависимость антимикробной активности полимеров от их минимальной ингибирующей концентрации приводится в таблице. Выявлено, что чем меньше значение минимальной ингибирующей концентрации (масс. %), тем выше биоцидный эффект.

Бактерицидные и фунгицидные свойства синтезированного поли-п-аминопиридинметакрилата

Bactericidal and fungicidal properties of synthesized poly-p-aminopyridine methacrylate

Вещества	Тест-культура		
	E. coli	*St. aureus*	*Can. alb.*
Поли-*п*-аминопиридинметакрилат	0,5	0,8	1,0

Таким образом, в данной работе синтезирован новый *п*-аминопиридинметакрилат и проведена его радикальная гомополимеризация в массе и растворе. Впервые показано, что полученный новый полимер обладает антимикробной активностью. Полученные результаты могут свидетельствовать о перспективности использования его в медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирован мономер *п*-аминопиридинметакрилат, изучена его радикальная гомополимеризация в присутствии инициатора – динитрила азобисизомасляной кислоты – как в массе, так и в растворе. Показано, что полимеризация протекает аналогично полимеризации винильных мономеров. Структура мономера и полученного на его основе полимера установлена на основании данных ИК- и ЯМР-спектроскопии. Показано, что полимеризация в массе протекает с автоускорением, ее скорость намного выше, чем при полимеризации метилметакрилата. Выявлено, что полученный полимер обладает антимикробными свойствами и его можно использовать в медицине в качестве биоцидных материалов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Frommeyer M., Bergander K., Steinbuchel A. Guanidination of soluble lysine-rich cyanophycin yields a homoarginine-containing polyamide // Applied and Environmental Microbiology. 2014. Vol. 80, no. 8. P. 2381–2389. https://doi.org/10.1128/AEM.04013-13.

2. Сивов Н.А., Клещева Н.А., Валуев И.Л., Валуев Л.И. Биоцидные сополимеры метакрилоилгуанидин гидрохлорида с метакриламидом и диаллилдиметиламмоний хлоридом//Высокомолекулярныесоединения(серияБ). 2021. Т. 63. N 5. P. 340–344. https://doi.org/10.31857/S2308113921050132.

3. Chen A., Er G., Zhang Ch., Tang J., Alam M., Hang T.T., et al. Antimicrobial anilinium polymers: the properties of poly(N,N-dimethylaminophenylenemethacrylamide) in solution and as coatings // Journal of Polymer Science. Part A: Polymer Chemistry. 2019. Vol. 57, no. 18. P. 1908–1921. https://doi.org/10.1002/pola.29314.

4. Малкандуев Ю.А., Хаширова С.Ю., Сарбашева А.И., Байдаева М.Х., Мартыненко А.И., Попова Н.И. [и др.]. Структура гуанидинсодержащих (со)полимеров и их биоцидные и токсические свойства // Известия вузов. Северо-кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2012. N 2. С. 71–75. EDN: OXHTSD.

5. Мусаев Ю.И., Мусаева Э.Б., Киржинова И.Х. Новые соединения на основе гуанидина и аминогуанидина // Фундаментальные исследования. 2011. N 12. С. 143–146. EDN: OFYRLN.

6. Kanth S., Puttaiahgowda Y.M., Nagaraja A., Bukva M. Recent advances in development of poly (dimethylaminoethyl methacrylate) antimicrobial polymers // European Polymer Journal. 2022. Vol. 163. P. 110930. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110930.

7. Tolosa J., Heras G.S., Carrión B., Segura T., Páez P.L., de Lera-Garrido F.J., et al. Structure-activity relationships for poly(phenylene)vinylene derivatives as antibacterial agents // Chemistry Select. 2018. Vol. 3. P. 7327. https://doi.org/10.1002/slct.201801287.

8. Bazanov D.R., Pervushin N.V., Savitskaya V.Yu., Anikina L.V., Proskurnina M.V., Lozinskaya N.A., et al. 2,4,5-Tris(alkoxyaryl)imidazoline derivatives as potent scaffold for novel p53-MDM2 interaction inhibitors: design, synthesis, and biological evaluation // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 2019. Vol. 29, no. 16. P. 2364–2368. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.06.007.

9. Лавров Н.А. Синтез, модификация и применение медицинских полимеров на основе N-винилсукцинимида (обзор) // Известия Санкт-Петербургского технологического института (Технического университета). 2018. N 46. С. 68–75. EDN: YTDYAP.

10. Yang Y., Cai Z., Huang Z., Tang X., Zhang X. Antimicrobial cationic polymers: from structural design to functional control // Polymer Journal. 2018. Vol. 50. P. 33–44. https://doi.org/10.1038/pj.2017.72.

11. Шальнова Л.И., Лавров Н.А. Получение и перспективы применения сополимеров гидразида N-винилсукцинаминовой кислоты как носителя биофункциональных веществ направленного действия // Пластические массы. 2019. N 9-10. С. 8–10. EDN: HSURLT. https://doi.org/10.35164/0554-2901-2019-9-10-8-10.

12. Gingasu D., Mindru I., Patron L., Ianculescu A., Vasile E., Marinescu G., et al. Synthesis and characterization of chitosan-coated cobalt ferrite nanoparticles and their antimicrobial activity // Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials. 2018. Vol. 28, no. 5. P. 1932–1941. https://doi.org/10.1007/s10904-018-0870-3.

13. Lee D., Lee Y.M., Jeong Ch., Lee J., Kim W.J. Bioreducible guanidinylated polyethylenimine for efficient gene delivery // ChemMedChem. 2014. Vol. 9, no. 12. P. 2718–2724. https://doi.org/10.1002/cmdc.201402293.

14. Menyashev M.R., Gerasin V.A., Guseva M.A., Merekalova N.D., Martynenko A.I., Sivov N.A. *trans*-Polyisoprene-based modified flaky silicates and nanocomposites with biocidal properties // Polymer Science, Series B: Chemistry. 2016. Vol. 58, no. 2. P. 226–234. https://doi.org/10.1134/S1560090416020032.

15. Tashiroa T. Antibacterial and bacterium adsorbing macromolecules // Macromolecular Materials and Engineering. 2001. Vol. 286, no. 2. P. 63–87. https://doi.org/10.1002/14392054(20010201)286:2<63::AID-MAME63>3.0.CO;2-H.

16. Muñoz-Bonilla A., Cerrada M.L., Fernández-Garsía M. Polymeric materials with antimicrobial activity: from synthesis to applications. RSC Publishing, 2014. P. 1–21.

17. Chambers H.F., De Leo F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era // Nature Review Microbiology. 2009. Vol. 7, no. 9. P. 629–641. https://doi.org/10.1038/nrmicro2200.

18. Гембицкий П.А., Воинцева И.И. Полимерный биоцидный препарат полигексаметиленгуанидин. Запорожье: Полиграф, 1998. 42 с.

19. Menyashev M.R., Gerasin V.A., Martynenko A.I., Kleshcheva N.A., Popova N.I., Sivov N.A. Features of reactions of radical (co)polymerization of methacryloylguanidine trifluoroacetate in various solvents // Polymer Science, Se-

ries B: Chemistry. 2017. Vol. 59, no. 6. P. 650–654. https://doi.org/10.1134/S1560090417060057.

20. Лачинов М.Б., Королев Б.А., Древаль В.Е., Череп Е.И., Зубов В.П., Кабанов В.А. Связь автоускорения при радикальной полимеризации // Высокомолекулярные соединения. 1982. Т. 24А. N 10. С. 2220–2226.

REFERENCES

1. Frommeyer M., Bergander K., Steinbuchel A. Guanidination of soluble lysine-rich cyanophycin yields a homoarginine-containing polyamide. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014;80(8):2381-2389. https://doi.org/10.1128/AEM.04013-13.

2. Sivov N.A., Kleshcheva N.A., Valuev I.L., Valuev L.I. Biocidal copolymers of methacryloylguanidine hydrochloride with methacrylamide and diallyldimethylammonium chloride. *Vysokomolekuljarnye soedinenija (serija B) = Polymer Science, Series B.* 2021;63(5):531-535. (In Russian). https://doi.org/10.31857/S2308113921050132.

3. Chen A., Er G., Zhang Ch., Tang J., Alam M., Hang T.T., et al. Antimicrobial anilinium polymers: the properties of poly(N,N-dimethylaminophenylenemethacrylamide) in solution and as coatings. *Journal of Polymer Science. Part A: Polymer Chemistry.* 2019;57(18):1908-1921. https://doi.org/10.1002/pola.29314.

4. Malkanduev Yu.A., Khashirova S.Yu., Sarbasheva A.I., Baydaeva M.K., Martynenko A.I., Popova N.I., et al. Structure of guanidine containing (co) polymers and their biocide and toxic properties. *Izvestija vuzov. Severo-kavkazskij region. Serija: Estestvennye nauki = Bulletin of Higher Educational Institutions. North Caucasus Region. Natural Sciences.* 2012;(2):71-75. (In Russian). EDN: OXHTSD.

5. Musaev Y.I., Musaeva E.B., Kirzhinova I.K. NOVEL Compositions on the basis of guanidine and aminoguanidine. *Fundamental'nye issledovanija.* 2011;(12):143-146. (In Russian). EDN: OFYRLN.

6. Kanth S., Puttaiahgowda Y.M., Nagaraja A., Bukva M. Recent advances in development of poly (dimethylaminoethyl methacrylate) antimicrobial polymers. *European Polymer Journal.* 2022;163:110930. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110930.

7. Tolosa J., Heras G.S., Carrión B., Segura T., Páez P.L., de Lera-Garrido F.J., et al. Structure-activity relationships for poly(phenylene)vinylene derivatives as antibacterial agents. *Chemistry Select.* 2018;3:7327. https://doi.org/10.1002/slct.201801287.

8. Bazanov D.R., Pervushin N.V., Savitskaya V.Yu., Anikina L.V., Proskurnina M.V., Lozinskaya N.A., et al. 2,4,5-Tris(alkoxyaryl)imidazoline derivatives as potent scaffold for novel p53-MDM2 interaction inhibitors: design, synthesis, and biological evaluation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.* 2019;29(16):2364-2368. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.06.007 .

9. Lavrov N.A. Synthesis, modification and use of medical polymers based on n-vinylsuccinimide (review). *Izvestija Sankt-Peterburgskogo tehnologicheskogo instituta (Tehnicheskogo universiteta).* 2018;(46):68-75. (In Russian). EDN: YTDYAP.

10. Yang Y., Cai Z., Huang Z., Tang X., Zhang X. Antimicrobial cationic polymers: from structural design to functional control. *Polymer Journal.* 2018;50:33-44. https://doi.org/10.1038/pj.2017.72.

11. Shal'nova L.I., Lavrov N.A. Obtaining and prospects for the use of hydrazide N-vinylsuccinamic acid copolymers as a carrier of biofunctional substances with directional effect. *Plasticheskie massy.* 2019; (9-10):8-10. (In Russian). EDN: HSURLT. https://doi.org/10.35164/0554-2901-2019-9-10-8-10.

12. Gingasu D., Mindru I., Patron L., Ianculescu A., Vasile E., Marinescu G., et al. Synthesis and characterization of chitosan-coated cobalt ferrite nanoparticles and their antimicrobial activity. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials.* 2018;28(5):1932-1941. https://doi.org/10.1007/s10904-018-0870-3.

13. Lee D., Lee Y.M., Jeong Ch., Lee J., Kim W.J. Bioreducible guanidinylated polyethylenimine for efficient gene delivery. *ChemMedChem.* 2014;9(12):2718-2724. https://doi.org/10.1002/cmdc.201402293.

14. Menyashev M.R., Gerasin V.A., Guseva M.A., Merekalova N.D., Martynenko A.I., Sivov N.A. *trans*-Polyisoprene-based modified flaky silicates and nanocomposites with biocidal properties. *Polymer Science, Series B: Chemistry.* 2016;58(2):226-234. https://doi.org/10.1134/S1560090416020032.

15. Tashiroa T. Antibacterial and bacterium adsorbing macromolecules. *Macromolecular Materials and Engineering.* 2001;286(2):63-87. https://doi.org/10.1002/14392054(20010201)286:2<63::AID-MAME63>3.0.CO;2-H.

16. Muñoz-Bonilla A., Cerrada M.L., Fernández-Garsía M. *Polymeric materials with antimicrobial activity: from synthesis to applications*. RSC Publishing; 2014, p. 1-21.

17. Chambers H.F., De Leo F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Review Microbiology.* 2009;7(9):629-641. https://doi.org/10.1038/nrmicro2200.

18. Gembickij P.A., Voinceva I.I. *Polymer biocydia polygexamethylenguanidine.* Zaporozh'e: Poligraf; 1998, 42 p. (In Russian).

19. Menyashev M.R., Gerasin V.A., Martynenko A.I., Kleshcheva N.A., Popova N.I., Sivov N.A. Features of reactions of radical (co)polymerization of methacryloylguanidine trifluoroacetate in various solvents. *Polymer Science, Series B: Chemistry.* 2017;59(6):650-654. https://doi.org/10.1134/S1560090417060057.

20. Lachinov M.B., Korolev B.A., Dreval' V.E., Cherep E.I., Zubov V.P., Kabanov V.A. The connection of auto performance in radical polymerization. *Vysokomolekuljarnye soedinenija.* 1982;24A(10):2220-2226. (In Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Вахабова Вусала Энам гызы,
научный сотрудник, диссертант,
Институт полимерных материалов
Министерства науки и образования
Азербайджанской Республики,
Az5004, г. Сумгаит, ул. С. Вургуна, 124,
Азербайджан,
vusalavahabova@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-6278-1047

Гулиев Казым Гафар оглы,
д.х.н., доцент, исполнительный директор,
Институт полимерных материалов Министерства
науки и образования Азербайджанской
Республики,
Az5004, г. Сумгаит, ул. С. Вургуна, 124,
Азербайджан,
✉ipoma@science.az; ndilbar@list.ru
https://orcid.org/0000-0002-2613-4459

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 19.10.2022.
Одобрена после рецензирования 13.04.2023..
Принята к публикации 31.08.2023..

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Vusala E. Vakhabova,
Researcher, Dissertation Student,
Institute of Polymer Materials
of the Ministry of Science and Education
of the Republic of Azerbaijan,
124, S. Vurgun St., Az5004, Sumgait, Azerbaijan,
vusalavahabova@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-6278-1047

Kazym G. Guliev,
Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor, Executive Director,
Institute of Polymer Materials of the Ministry
of Science and Education of the Republic
of Azerbaijan,
124, S. Vurgun St., Az5004, Sumgait, Azerbaijan,
✉ipoma@science.az; ndilbar@list.ru
https://orcid.org/0000-0002-2613-4459

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

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.

Информация о статье

The article was submitted 19.10.2022.
Approved after reviewing 13.04.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 577.15:663.15
EDN: EWIDYI
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-340-349

Исследование ферментативной активности экстрактов из биомассы высших грибов для получения молочнокислых продуктов

Д.В. Минаков*,✉, Я.В. Уразова*,***, Н.Г. Базарнова*, С.Л. Тихонов***, М.В. Минакова****

**Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Российская Федерация*
***Бийский технологический институт – филиал Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова, г. Бийск, Российская Федерация*
****Уральский государственный экономический университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация*

Аннотация. *Статья посвящена исследованию ферментативной активности и химического состава экстрактов, полученных из субстратного мицелия высших грибов. Объектом исследования является биомасса мицелия грибов Piptoporus betulinus (субстратный мицелий), полученная методом твердофазного культивирования на растительном субстрате. Для получения экстрактов использовали дистиллированную воду (pH=7,0), ацетатный (pH=4,7), фосфатный (pH=7,4) и буфер McIlvaine (pH=4,0). В работе определяли молокосвертывающую, протеолитическую, целлюлозолитическую и липолитическую активности, а также содержание белковых веществ в водном и буферных экстрактах. В результате проведенных исследований было установлено, что в извлечениях из субстратного мицелия P. betulinus, полученных дистиллированной водой и буферами, значения целлюлозолитической (3,75–3,90 ед/г), липолитической (40,00–44,24 ед/г) и молокосвертывающей (65,80–66,60 ед/мл) активности отличаются незначительно. Значения протеолитической активности изменялись от 0,22 до 0,78 ед/мл. Наиболее эффективным растворителем для получения высоких значений молокосвертывающей активности является дистиллированная вода. Концентрация белковых веществ в нативном водном экстракте из субстратного мицелия P. betulinus составила 14,50 мг/мл. Очистка экстракта микрофильтрацией и бентонитом приводит к значительному снижению концентрации белка (до 5,90 мг/мл), целлюлозолитической (до 1,40 ед/г), липолитической (до 5,30 ед/г) и протеолитической (до 0,11 ед/мл) активности и повышению значений молокосвертывающей активности (до 285,80 ед/мл). Бентонит сорбирует целлюлозолитические, липолитические и неспецифические протеолитические ферменты, за счет чего происходит очевидное повышение значений молокосвертывающей активности. Установлен высокий показатель соотношения молокосвертывающей к протеолитической активности у водного экстракта грибов P. betulinus – 2598,20, что, возможно, приведет к повышению выхода, улучшению органолептических свойств и увеличению срока хранения сыров.*

Ключевые слова: *культивирование, Piptoporus betulinus, экстракты, ферментативная активность, буферы, белковые вещества*

Финансирование. *Авторы благодарят за финансовую поддержку Минобрнауки РФ (тема № 075-00316-20-01, FZMM-2020-0013, мнемокод 0611-2020-013).*

Для цитирования: Минаков Д.В., Уразова Я.В., Базарнова Н.Г., Тихонов С.Л., Минакова М.В. Исследование ферментативной активности экстрактов из биомассы высших грибов для получения молочнокислых продуктов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 340–349. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-340-349. EDN: EWIDYI.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Enzymatic activity of extracts from higher fungi for manufacturing fermented dairy products

Denis V. Minakov*,*✉, Yana V. Urazova*,***, Natalya G. Bazarnova*, Sergei L. Tikhonov***, Marianna V. Minakova****

**Altai State University, Barnaul, Russian Federation*
***Biysk Institute of Technology (branch) of the Polzunov Altai State Technical University, Biysk, Russian Federation*
****Ural State Economic University, Yekaterinburg, Russian Federation*

© Минаков Д.В., Уразова Я.В., Базарнова Н.Г., Тихонов С.Л., Минакова М.В., 2023

Abstract. *The present study investigates the enzymatic activity and chemical composition of extracts obtained from the substrate mycelium of higher fungi. The investigated object is the biomass of fungi Piptoporus betulinus (substrate mycelium) gathered after solid-phase cultivation on natural substrate. The extracts were obtained using distilled water (pH=7.0), acetate (pH=4.7) and phosphate (pH=7.4) buffers, and McIlvaine buffer (pH=4.0). Milk-clotting, proteolytic, cellulosolytic and lipolytic activity, as well as protein content, were determined in both aqueous or buffer extracts. As a result, the values of cellulosolytic (3.75–3.90 units/g), lipolytic (40.00–44.24 units/g) and milk-clotting (65.80–66.60 units/mL) activity of the substrate mycelium was determined. These values differ slightly in the extracts prepared on distilled water and buffers. Moreover, the concentration of protein substances in the native aqueous extract from the substrate mycelium of P. betulinus was 14.50 mg/mL. The values of proteolytic activity varied from 0.22 to 0.78 units/mL. Distilled water was found to be the most effective solvent for achieving high values of milk-clotting activity. Extract purification by microfiltration or with bentonite leads to a significant decrease in protein concentration (up to 5.90 mg/mL), cellulose- (up to 1.40 units/g), lipo- (up to 5.30 units/g), and proteolytic (up to 0.11 units/mL) activity, and an increase in milk-clotting activity values (up to 285.80 units/mL). The bentonite sorbs cellulosolytic, lipolytic, and non-specific proteolytic enzymes, resulting in a noticeable increase in the value of milk-clotting activity. In the aqueous extract of P. betulinus fungi, a high ratio of milk-clotting to proteolytic activity was found with a value of 2598.20. This may lead to an increased yield and improvement of the organoleptic properties of cheese and its storage period.*

Keywords: *cultivation, Piptoporus betulinus, extracts, enzymatic activity, buffers, proteins*

Funding. *This work was supported by the project 075-00316-20-01 (FZMM-2020-0013, mnemocode 0611-2020-013) from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.*

For citation: Minakov D.V., Urazova Ya.V., Bazarnova N.G., Tikhonov S.L., Minakova M.V. Enzymatic activity of extracts from higher fungi for manufacturing fermented dairy products. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(3):340-349. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-340-349. EDN: EWIDYI.

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты являются природными катализаторами, которые нашли широкое применение в различных отраслях промышленности и биотехнологии. Одной из крупнейших групп ферментов с перспективой роста около 7% в год являются протеазы. Данная группа ферментов активно применяется в пищевой, фармацевтической и химической промышленности [1, 2].

Микробные протеазы по сравнению с ферментами растительного и животного происхождения в наибольшей степени являются востребованными из-за биотехнологического процесса их производства, что дает возможность получать продукт за более короткий период времени [3]. К продуцентам микробных ферментов относят различные виды бактерий и грибов. В последнее время перспективными продуцентами протеолитических ферментов являются высшие базидиальные грибы (отдел *Basidiomycota*), токсикологическая безопасность которых подтверждена Всемирной организацией здравоохранения [4]. Известно, что к этому отделу относятся грибы, разрушающие растительные субстраты. За счет выделения мицелием большого количества различных классов ферментов (целлюлазы, гемицеллюлазы, пектиназы, ферменты лигниназного комплекса) происходит микогенный ксилолиз – деструкция компонентов растительной клеточной стенки – целлюлозы, лигнина, гемицеллюлозы [5–7].

Биоконверсия растительного сырья высшими грибами представляет собой альтернативный подход к производству промышленно важных продуктов с высокой добавленной стоимостью [8]. Использование технологии твердофазной ферментации грибов позволяет существенно снизить энергозатраты при производстве ферментов за счет статических условий культивирования продуцентов в простых конструкциях биореакторов на лигноцеллюлозных отходах сельскохозяйственной и деревоперерабатывающей промышленности [9, 10].

В качестве перспективного направления можно отметить группу протеолитических ферментов, способных коагулировать белок молока и являющихся важным функционально необходимым компонентом, который применяется для производства большинства групп сыров. Многочисленные исследования продемонстрировали присутствие таких ферментов у съедобных и лекарственных видов грибов, в том числе *Flammulina velutipes, Pleurotus ostreatus, Grifola frondosa, Tricholoma saponaceum*, *Armillaria mellea, Russula decolorans, Coprinus lagopides, Irpex lacteus, Fomitopsis pinicola*. В процессе глубинного и твердофазного культивирования данные виды грибов продуцируют сериновые, щелочные, фибринолитические, металлозависимые протеазы, плеррин, эрингеолизин, небродеолизин, гемолизин, лакказные изоферменты, аминопептидазы и сигнальные пептидазы [11–14].

Вышеперечисленные грибы, за исключением *Russula* и *Coprinus*, относятся к дереворазрушающим, что дает возможность культивировать мицелий твердофазным способом на лигноцеллюлозных субстратах. Однако на сегодняшний день в литературе в основном описаны питательные среды для получения молокосвертывающих ферментов из высших грибов с использованием технологии глубинного культивирования [11, 12]. Субстраты для твердофазного культивирования высших грибов – продуцентов ферментов молокосвертывающего действия – представлены в литературных источниках в ограниченном количестве [15].

Несмотря на широкий перечень грибов, протеолитическая активность базидиомицетов недостаточно исследована и их потенциал в сфере биотехнологического производства полностью не раскрыт. Сегодня исследователями продолжается поиск по обнаружению новых протеаз, обладающих свойствами, для их коммерческого применения [16–18]. Детальное исследование ферментативной активности и химического состава продуцентов

протеолитических ферментов среди высших базидиомицетов, культивируемых на растительных субстратах, позволит создать технологию их производства в промышленном масштабе, учитывая доступность сырьевых источников.

Целью работы является исследование ферментативной активности и химического состава экстрактов из субстратного мицелия высших грибов для получения молочнокислых продуктов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследованиях использовали культуру высшего базидиального гриба *Piptoporus betulinus* D-21, полученную тканевым способом из плодовых тел, собранных с древесины березы в лесной зоне Алтайского края. Получение чистой культуры мицелия проводили на питательной среде сусло-агар. Контроль чистоты мицелия осуществляли методом световой микроскопии (Carl Zeiss Primo Star) на наличие/отсутствие пряжек и микофильных грибов. Идентификацию вида производили по получению и описанию плодовых тел в искусственной культуре. Хранение штамма осуществляли на сусло-агаре в чашках Петри при температуре 5±2 °С.

Для получения посевного мицелия использовали зерно пшеницы, приготовленное по методике, описанной в работе [13]. Подготовленное зерно помещали в колбы Эрленмейера объемом 500 мл на 2/3 части, стерилизовали (при 0,1 МПа 1,5 ч) и засевали цилиндрическими блоками мицелия диаметром 8 мм, вырезанные с помощью пробойника из зоны роста семисуточной культуры штамма в чашке Петри. Культивирование мицелия на зерне проводили в термостате ТСО-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре 26±1 °С до полного зарастания в течение 14 суток.

В качестве лигноцеллюлозных субстратов для твердофазного культивирования мицелия грибов использовались березовые опилки (размер частиц 4–10 мм) и пшеничные отруби в соотношении 5:1. В субстрат добавляли дистиллированную воду и перемешивали для создания относительной влажности 60%.

Стерилизацию древесного субстрата в полипропиленовых контейнерах объемом 1,2 дм^3 осуществляли в автоклаве ВК-75 (АО «ТЗМОИ», Россия) при избыточном давлении 0,1 МПа в течение 1,5 ч.

В простерилизованный древесный субстрат вносили зерновой мицелий в количестве 5% от общей массы и тщательно перемешивали с помощью металлического шпателя. Субстрат, инокулированный мицелием, помещали в суховоздушный термостат (ТСО-1/80 СПУ) и инкубировали при температуре 26±2 °С. Зарастание растительного субстрата происходило в течение 20 суток. Отделение мицелия с поверхности древесного субстрата осуществляли с помощью микробиологической иглы. Для этого субстратный блок разламывали на частицы размером 5–10 мм и отбирали 10 образцов (проб) для оценки качества мицелия методом световой микроскопии с изучением микроморфологических признаков.

Экстракцию ферментов из субстратного мицелия проводили по следующей методике: навеску в количестве 10 г влажностью 50±5% помещали в фарфоровую ступку и растирали пестиком с 0,25 г оксида алюминия до однородного состояния. Затем к полученной массе при гидромодуле 1:10 добавляли исследуемые экстрагенты: дистиллированная вода, ацетатный (pH=4,7), фосфатный (pH=7,4) буферы и буфер McIlvaine (pH=4,0). Смесь тщательно перемешивали и оставляли в статических условиях в течение 15 мин. Далее полученную суспензию выдерживали в термостате при 30 °С в течение 30 мин для более полного экстрагирования ферментов из субстратного мицелия. После чего проводили фильтрование через ватно-марлевые фильтры, получая нативные экстракты и под вакуумом используя мембранные фильтры «Владипор» марки МФАС-ОС-2 с размером пор 0,45 мкм, получая микрофильтраты [19].

Очистку экстрактов бентонитовой глиной (ОСТ 18-49-71) проводили по методике, описанной в работе [20], с некоторыми модификациями: к 100 мл экстракта добавляли 2,0 г бентонитовой глины, смесь перемешивали в течение 40 мин при 180 об/мин. Полученную суспензию дополнительно выдерживали в статических условиях в течение 3 ч для осаждения частиц бентонита. Отработанный бентонит отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин. Полученный раствор фильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм и использовали для исследований.

Определение молокосвертывающей активности (МСА) проводили по методике, предложенной Каваи и Мукаи, описанной в ранее опубликованной работе [21]. Сущность методики заключается в определении времени свертывания молока, содержащего раствор хлористого кальция при добавлении экстракта, содержащего фермент.

Определение общей протеолитической активности (ПА) проводили методом Ансона на субстрате, содержащем казеин, по ГОСТ 34430–20182 применительно к слабокислым протеазам (при pH=5,3).

Определение концентрации белка проводили по общей фармакопейной статье ОФС. 1.2.3.0012.15 с использованием колориметрического метода Брэдфорда. Сущность метода заключается в связывании реагента Coomassie brilliant blue R-250 (кумасси бриллиантовый синий) с аминокислотными остатками белка – аргинином, триптофаном, тирозином, гистидином и фенилаланином. При связывании происходит сдвиг максимума поглощения с длины волны, равной 470 нм (свободный краситель), до 595 нм (связанный), при этой длине волны и проводятся все измерения[1].

Целлюлозолитическую активность (ЦА) определяли по выходу редуцирующих сахаров при ферментативном гидролизе 2,0% натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы в соответствующих водном и буферных экстрактах при температуре 35 °С в течение 1 мин. Количество редуцирующих сахаров устанавливали методом Бертрана по ГОСТ 13192-73. За одну единицу ЦА принимают такое количество фермента, которое приводит к образованию 1,0 микромоль глюкозы [20].

Липолитическую активность (ЛА) определяли по выходу титруемых жирных кислот, образовавшихся в результате ферментативной реакции водного и буферных

[1]Общая фармакопейная статья. 1.2.3.0012.15 Определение белка (Метод Брэдфорда. Колориметрический) // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. М.: 2018.

экстрактов с пастеризованными молочными сливками (25%-й жирности) в присутствии 0,01 М раствора хлорида кальция при температуре 35 °С в течение 60 мин. За единицу ЛА принимают такое количество фермента, которое приводит к образованию свободных жирных кислот при ферментативной реакции, эквивалентное титрованию 1,0 мл 0,05 М раствором гидроксида натрия [20].

Исследования проводились в 3-кратной повторности. Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с использованием программы MS Excel 2010.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время большинство технологий для производства ферментов основано на глубинной ферментации. Однако, несмотря на это, продолжает расти интерес к твердофазным культурам, поскольку количество ферментов, секретируемых мицелиальными грибами в растительные субстраты, часто превышает содержание ферментов, полученных в глубинной культуре [22]. Например, мицелий грибов *Aspergillus oryzae*, культивируемый на пшеничных отрубях, продуцирует в 500 раз больше фермента химозина, чем в глубинной культуре [23].

В наших исследованиях использовали технологию твердофазного культивирования мицелия *P. betulinus* на березовых опилках и пшеничных отрубях (рисунок).

Растительные субстраты, колонизированные мицелием грибов

Plant substrates colonized by fungi mycelium

После полной колонизации субстрата было проведено извлечение экстрактивных веществ, содержащих протеолитические ферменты молокосвертывающего действия. Известно, что в процессе биодеструкции растительных субстратов грибы выделяют комплекс ферментов [24]. Поэтому был проведен скрининг ферментативной активности полученных экстрактов. Определяли целлюлозолитическую, липолитическую, протеолитическую и молокосвертывающую активности.

Целлюлазные примеси, содержащиеся в ферментных препаратах, оказывают разрушающее действие на хлопчатобумажные прессы, используемые в сыроделии для формирования сыров. Липолитические ферменты также оказывают отрицательное действие на процесс изготовления сыров. С действием липаз на жиры молока увеличивается содержание свободных жирных кислот в молочной сыворотке и сгустке, уменьшается выход сыра, развивается более пресный вкус сыра и изменяются физические характеристики сыров [20]. ПА молокосвертывающих ферментов выражается в двух формах. Первая – это специфическая МСА, равная степени протеолиза в отношении расщепления связи Phe105-Met106 в молекуле каппа-казеина. Вторая форма – общая ПА, равная степени неспецифического протеолиза в отношении расщепления любых пептидных связей в казеинах молока, что может приводить к существенному гидролизу белков до пептидов и аминокислот, снижая качество сыров на стадии созревания, разжижая молочный сгусток [25].

В табл. 1 представлены результаты определения ферментативной активности водных и буферных экстрактов из субстратного мицелия.

В качестве контрольных образцов использовали водные и буферные экстракты из растительного субстрата без мицелия. В результате было установлено, что данные экстракты не проявляли МСА.

Установлено, что независимо от используемого растворителя значения ЦА и МСА нативных экстрактов из субстратного мицелия остаются практически неизменными. При этом выявлено существенное влияние растворителей на ПА и незначительное на ЛА. На все виды ферментативной активности наибольшее влияние оказала обработка экстрактов бентонитом.

ЦА нативных экстрактов, полученных с использованием воды и буферных растворителей, составила от 3,75 (ацетатный буфер) до 3,90 ед/г (дистиллированная вода). Применение процесса микрофильтрации привело к незначительному снижению ЦА. Последующая обработка бентонитом позволила снизить ЦА по сравнению с нативным экстрактом в 3 раза.

ЛА экстрактов составила от 40,00 (вода) до 44,24 ед/г (фосфатный буфер). Значительное снижение активности экстрактов также было обнаружено при их обработке бентонитом, наименьшая ЛА (5,30 ед/г) установлена при использовании в качестве экстрагента дистиллированной воды.

ПА полученных экстрактов без очистки составила от 0,22 (буфер McIlvaine) до 0,78 ед/мл (фосфатный буфер). При получении ацетатного и водного экстрактов ПА после микрофильтрации (0,12 ед/мл) и очистки бентонитом (0,11 ед/мл) снижается в 4,6 и 5,6 раз соответственно. При экстрагировании мицелиального субстрата фосфатным буфером после микрофильтрации наблюдается снижение ПА в 2,3 раза, а после очистки бентонитом – в 3,5 раза. ПА экстрактов, полученных с использованием буфера McIlvaine, снижается в 1,6 раза после пропускания экстракта через фильтр с размером пор 0,45 мкм и при обработке бентонитом в 1,8 раза.

Несмотря на снижение ЦА, ЛА и ПА в результате микрофильтрации и обработки бентонитом, установлено существенное повышение уровня МСА экстрактов. Наибольшее значение МСА было обнаружено при очистке бентонитом и составило 285,8 ед/мл, что выше значений МСА экстракта после микрофильтрации и неочищенного экстракта в 2,4 и 4,3 раза соответственно.

Поскольку уровень МСА при экстрагировании ферментов не зависит от растворителя, для промышленного получения фермента целесообразно использовать дистиллированную воду. По значению МСА мицелий грибов

Таблица 1. Ферментативная активность экстрактов *P. betulinus*

Table 1. Enzymatic activity of extracts *P. betulinus*

Образец	Экстрагент			
	Вода	Фосфатный буфер	Ацетатный буфер	Буфер McIlvaine
Целлюлозолитическая активность, ед/г				
НЭ*	3,90±0,40	3,80±0,50	3,75±0,60	3,85±0,50
М**	3,20±0,20	3,15±0,40	3,24±0,40	3,32±0,30
Б***	1,40±0,20	1,20±0,20	1,30±0,30	1,25±0,10
Липолитическая активность, ед/г				
НЭ	40,00±4,00	44,24±2,00	42,40±1,00	42,50±2,00
М	39,20±3,00	42,10±4,00	41,00±2,00	41,60±2,00
Б	5,30±1,00	10,20±2,00	7,58±2,00	6,28±1,00
Молокосвертывающая активность, ед/мл				
НЭ	66,60±2,00	66,30±1,00	65,80±2,00	66,50±2,00
М	117,60±3,00	117,40±2,00	116,70±3,00	117,10±2,00
Б	285,80±4,00	285,50±4,00	284,90±4,00	285,70±4,00
Протеолитическая активность, ед/мл				
НЭ	0,67±0,02	0,78±0,02	0,56±0,02	0,22±0,02
М	0,12±0,01	0,34±0,02	0,12±0,02	0,14±0,01
Б	0,11±0,01	0,22±0,01	0,11±0,01	0,12±0,02
Соотношение молокосвертывающей активности к протеолитической активности				
НЭ	99,40	85,00	117,50	302,30
М	980,00	345,30	972,50	836,40
Б	2598,20	1297,70	2590,00	2380,80

Примечание. * – нативный экстракт; ** – микрофильтрация; *** – обработка бентонитом.

Таблица 2. Показатели молокосвертывающей и протеолитической активности водного экстракта *P. betulinus* в сравнении с ферментами других видов высших грибов

Table 2. Indicators of MCA and PA of *P. betulinus* water extract in comparison with enzymes of other higher fungi species

Образец	Молокосвертывающая активность, ед/мл	Протеолитическая активность, ед. ПА/мл	Молокосвертывающая активность/ протеолитическая активность
Водный экстракт *P. betulinus* после микрофильтрации и обработки бентонитом	285,80±0,10	0,110±0,010	2598,20
Hericium erinaceum NBRC 100328*	241,00	0,150	1607,00
Hericium erinaceum MAFF430234*	364,00	0,164	2219,00
Pleurotus ostreatus YFH 060301*	29,00	0,170	171,00
Lentinula edodes NBRC 6654*	16,00	0,074	216,00
Laetiporus sulphureus NBRC 6496*	17,00	0,022	773,00
Grifola frondosa NBRC 7040*	17,00	0,056	304
Piptoporus soloniensis 279.55*	2,55±0,12	0,050±0,003	51,00±2,21

Примечание. * – литературные данные [27].

P. betulinus представляет значительный практический интерес для разработки технологии производства ферментных препаратов.

Снижение целлюлозолитической, липолитической и протеолитической активности экстрактов при очистке бентонитом напрямую связано с механизмом его действия, который способствует осветлению экстракта вследствие процессов флокуляции и адсорбции мутящих частиц и пигментных примесей, стабилизации за счет адсорбции белка, окислительных ферментов, неспецифических протеолитических ферментов, липидов, полисахаридов, нуклеиновых кислот и других соединений, которые способны вступать в реакцию между собой [20].

Известно, что критерием оценки неспецифической ПА фермента является не абсолютная величина ПА, а ее доля от МСА. Важным условием, определяющим пригодность фермента для свертывания молока в сыроделии, является соотношение его МСА к общей ПА. Соотношение МСА/ПА выражает долю «полезной» активности фермента [12, 25, 26]. Повышение соотношения МСА/ПА у фермента обеспечивает стабильно высокую скорость свертывания молока, повышает выход сыра (на 0,5–1,5%), улучшает органолептические свойства и увеличивает срок хранения.

Для проведения сравнительной оценки соотношения МСА/ПА с ферментами других видов грибов был выбран водный экстракт *P. betulinus* после микрофильтрации и обработки бентонитом, т.к. обладает более высоким соотношением МСА/ПА в отличие от буферных экстрактов. Статистические данные по соотношению МСА/ПА приведены в табл. 2.

При проведении сравнительной оценки очищенного бентонитом водного экстракта из грибов *P. betulinus* с экстрактами ферментов других видов высших грибов было установлено, что значения МСА и ПА близки к значениям базидиального гриба ежовика гребенчатого – *Hericium erinaceum* NBRC 100328, *H. erinaceum* MAFF430234. При этом МСА экстракта *P. betulinus* значительно превышает активность грибов *Pleurotus ostreatus* YFH 060301, *Lentinula edodes* NBRC 6654, *Laetiporus sulphureus* NBRC 6496, *Grifola frondosa* NBRC 7040 и *Piptoporus soloniensis* 279.55. Эти данные позволяют рекомендовать водный экстракт для разработки технологии получения ферментного препарата за счет проведения дополнительных технологических операций – концентрирования и сушки.

Количественное определение белка в экстрактах субстратного мицелия является важным этапом при очистке фермента. Существует множество методов измерения концентрации белка, однако наиболее часто цитируемым в научной литературе является колориметрический метод Бредфорда. К преимуществам данного метода можно отнести минимальную погрешность определения не более 10%, быстроту и удобство исполнения.

Анализ экстрактов показал, что концентрация белковых веществ варьирует от 5,80 до 14,50 мг/мл в зависимости от используемого растворителя и способа очистки (табл. 3).

Высокое содержание белковых веществ в неочищенных экстрактах субстратного мицелия 11,90–14,50 мг/мл может быть связано с дополнительным извлечением белка из растительного субстрата, используемого в качестве питательной среды для мицелия. Установлено, что при пропускании экстрактов через фильтр с размером пор 0,45 мкм наблюдается незначительное снижение концентрации белковых веществ. Однако при обработке экстрактов бентонитом происходит существенное снижение концентрации белка в 2,0–2,4 раза в экстрактах, полученных с использованием ацетатного, фосфатного буферов, буфера McIlvaine и дистиллированной воды соответственно. Это связано прежде всего с механизмом действия бентонита на белковые составляющие. Бентонит, как уже упоминалось выше, вследствие процессов адсорбции и флокуляции способен сорбировать на себя белковые вещества, тем самым уменьшать их количество в смеси.

Таким образом, было установлено, что экстракты, полученные растиранием субстрата (мицелия) с оксидом алюминия с растворителями с последующей микрофильтрацией и обработкой бентонитом, обладают высокой МСА (до 285,8 мг/ед) и низкими ПА (до 0,11 мг/ед), ЦА (до 1,40 ед/г) и ЛА (до 10,20 ед/г). Наиболее эффективным растворителем следует считать дистиллированную воду. Дополнительная очистка экстрактов микрофильтрацией и бентонитом позволила существенно повысить уровень МСА и снизить концентрацию белка, вероятно, за счет удаления из жидкого экстракта нежелательных белковых веществ, окислительных ферментов и неспецифических протеолитических ферментов. Полученные результаты могут найти применение при производстве молочнокислых продуктов – сыров, йогурта, сметаны.

ВЫВОДЫ

Установлено, что в экстрактах из субстратного мицелия *P. betulinus*, полученных дистиллированной водой и буферными растворителями, значения ЦА (3,75–3,90 ед/г),

Таблица 3. Содержание белковых веществ в экстрактах субстратного мицелия *P. betulinus*

Table 3. Protein substances content in extracts of substrate mycelium *P. betulinus*

Образец	Растворитель			
	Вода	Фосфатный буфер	Ацетатный буфер	Буфер McIlvaine
Содержание белка, мг/мл				
НЭ*	14,50±0,50	11,95±0,50	11,90±0,40	13,90±0,50
М**	13,20±0,20	11,60±0,50	9,10±0,20	10,80±0,40
Б***	5,90±0,10	5,85±0,10	5,80±0,10	5,95±0,10

Примечание. * – нативный экстракт; ** – микрофильтрация; *** – обработка бентонитом.

ЛА (40,00–44,24 ед/г) и МСА (65,80–66,60 ед/мл) отличаются незначительно. Значения ПА изменялись от 0,22 до 0,78 ед/мл. Водные экстракты характеризуются высокой МСА и низкими ЦА, ЛА, ПА.

Концентрация белковых веществ в нативном водном экстракте из субстратного мицелия *P. betulinus* составила 14,50 мг/мл. Очистка экстракта микрофильтрацией и бентонитом приводит к значительному снижению концентрации белка (до 5,90 мг/мл), ЦА (до 1,40 ед/г), ЛА (до 5,30 ед/г) и ПА (до 0,11 ед/мл) и повышению МСА (до 285,80 ед/мл).

Установлен высокий показатель отношения МСА к ПА у водного экстракта грибов *P. betulinus* – 2598,20, что, возможно, приведет к повышению выхода, улучшению органолептических свойств и увеличению срока хранения при получении сыров.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Fasim A., More V.S., More S.S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses // Current Opinion in Biotechnology. 2021. Vol. 69. P. 68–76. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002 .

2. Kishimoto M., Nakamura K., Kanemaru K., Tasaki T., Nakamura T., Sato K., et al. Crude enzymes from a *Hericium* edible mushroom isolated in Japan: variability in milk-clotting activity and the ability to coagulate ultra-high-temperature pasteurized milk // Food Science and Technology Research. 2018. Vol. 24, no. 1. P. 139–143. https://doi.org/10.3136/fstr.24.139 .

3. Christensen L.F., García-Béjar B., Bang-Berthelsen C.H., Hansen E.B. Extracellular microbial proteases with specificity for plant proteins in food fermentation // International Journal of Food Microbiology. 2022. Vol. 381. P. 109889. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109889

4. Sommano S.R., Suksathan R., Sombat T., Seehanam P., Sirilun S., Ruksiriwanich W., et al. Novel perspective of medicinal mushroom cultivations: a review case for «Magic» mushrooms // Agronomy. 2022. Vol. 12, no. 12. P. 3185. https://doi.org/10.3390/agronomy12123185.

5. Usman A., Mohammed S., Mamo J. Production, optimization, and characterization of an acid protease from a filamentous fungus by solid-state fermentation // International Journal of Microbiology. 2021. Vol. 190. P. 1–12. https://doi.org/10.1155/2021/6685963.

6. Prabhu G., Bhat D., Bhat R.M., Selvaraj S. A critical look at bioproducts co cultured under solid state fermentation and their challenges and industrial applications // Waste and Biomass Valorization. 2022. Vol. 13, no. 4. P. 3095–3111. https://doi.org/10.1007/s12649-022-01721-0.

7. Petraglia T., Latronico T., Liuzzi G.M., Fanigliulo A., Crescenzi A., Rossano R. Edible mushrooms as source of fibrin(ogen)olytic enzymes: comparison between four cultivated species // Molecules. 2022. Vol. 27, no. 23. P. 8145. https://doi.org/10.3390/molecules27238145.

8. Berger R.G., Ersoy F. Improved foods using enzymes from basidiomycetes // Processes. 2022. Vol. 10, no. 4. P. 726. https://doi.org/10.3390/pr10040726

9. Pallavi P., Avanti K., Pallavi K. Production of milk clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* under solid-state fermentation using mixture of wheat bran and rice bran // International Journal of Scientific and Research Publications. 2012. Vol. 2, no. 10. P. 1–12.

10. Hamrouni R., Molinet J., Mitropoulou G., Kourkoutas Y., Dupuy N., Masmoudi A., et al. From flasks to single used bioreactor: scale-up of solid-state fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum* // Journal of Environmental Management. 2019. Vol. 252, no. 2. P. 109496. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109496.

11. Lebedev L.R., Kosogova T.A., Teplyakova T.V., Kriger A.V., Elchaninov V.V., Belov A.N., et al. Study of technological properties of milk-clotting enzyme from *Irpex lacteus* (*Irpex lacteus* (Fr.) Fr.) // Foods and Raw Materials. 2016. Vol. 4, no. 2. P. 58–65. https://doi.org/10.21179/2308-4057-2016-2-58-65.

12. Shamtsyan M., Dmitriyeva T., Kolesnikov B., Denisova N. Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom // LWT – Food Science and Technology. 2014. Vol. 58, no. 2. P. 343–347. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.009.

13. Melanouri E., Dedousi M., Diamantopoulou P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase // Carbon Resources Conversion. 2021. Vol. 5, no. 1. P. 61–70. https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.12.004.

14. Cho N.S., Wilkolazka A.J., Staszczak M., Cho H.Y., Ohga S. The role of laccase from white rot fungi to stress conditions // Journal of the Faculty of Agriculture. 2009. Vol. 54, no. 1. P. 81–83. https://doi.org/10.5109/14041.

15. Thomas L., Larroche H., Pandeya A. Current developments in solid-state fermentation // Biochemical Engineering Journal. 2013. Vol. 81. P. 146–161. https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2013.10.013.

16. Salomao R.M., Larissa S.C.S., Leilane B.S., Edson J.C., Mircella M.A., Marne C.V., et al. Teixeira *Pleurotus albidus*: a new source of milk-clotting proteases // African Journal of Microbiology Research. 2017. Vol. 11, no. 17. P. 660–667. https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8520.

17. Cirium V.C., Vidya C., Rani A., Singh S.A. Production of highly active fungal milk-clotting enzyme by solid-state fermentation // Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2019. Vol. 49, no. 9. P. 858–867. https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1630647.

18. Zagnitko Yu.P. Some physical and chemical properties of enzymic preparations derived from strain V-02 of *Irpex lacteus* FR. Immunology // Allergology, Infectiology (Section: Fingal Biotechnologies in Medicine and Industry). 2010. Vol. 1. P. 60–65.

19. Sato K., Goto K., Suzuki A., Miura T. Characterization of a milk-clotting enzyme from *Hericium erinaceum* and its proteolytic action on bovine caseins // Food Science and Technology Research. 2018. Vol. 24, no. 4. P. 669–676. https://doi.org/10.3136/fstr.24.669.

20. A.C. N 962303, СССР, C12N 9/58. Способ очистки молокосвертывающего ферментного препарата из

Mucor, Pusillus, Mucor michei / К.А. Калунянц, Т.А. Смирнова, В.М. Денисов, Р. Джалмухамедова, А.П. Шарапов, Н.П. Шурупова. Заявл. 25.12.1980; опубл. 30.09.1982.

21. Минаков Д.В., Уразова Я.В., Минакова А.А. Скрининг и исследование продуцентов молокосвертывающих ферментов среди культур высших базидиальных грибов // Ползуновский вестник. 2022. N 3. С. 173–180. https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2022.03.024. EDN: LFMEJT.

22. Mamo J., Getachew P., Kuria M.S., Assefa F. Application of milk-clotting protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for danbo cheese production // Journal of Food Quality. 2020. Vol. 4. P. 1–12. https://doi.org/10.1155/2020/8869010.

23. Kumura H., Saito C., Taniguchi Y., Machiya T., Takahashi Y., Kobayashi K., et al. Adjunctive application of solid-state culture products from *Aspergillus oryzae* for semi-hard cheese // Advances in Dairy Research. 2017. Vol. 5, no. 3. P. 188. https://doi.org/10.4172/2329-888X.1000188.

24. Musoni M., Destain J., Thonart P., Bahama J., Delvigne F. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems // Biotechnology, Agronomy and Society and Environment. 2015. Vol. 19, no. 4. P. 430–442.

25. Мягконосов Д.С., Абрамов Д.В., Делицкая И.Н., Овчинникова Е.Г. Протеолитическая активность молокосвертывающих ферментов разного происхождения // Пищевые системы. 2022. Т. 5. N 1. С. 47–54. https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54. EDN: FKAOJB.

26. Kishimoto M., Nakamura K., Kanemaru K., Tasaki T., Nakamura T., Sato K., et al. Crude enzymes from a *Hericium* edible mushroom isolated in Japan: variability in milk-clotting activity and the ability to coagulate ultra-high-temperature pasteurized milk // Food Science and Technology Research. 2018. Vol. 24, no. 1. P. 139–143. https://doi.org/10.3136/fstr.24.139.

27. Nakamura K., Kobayashi N., Tanimoto M. Screening of edible mushrooms producing milk-clotting enzyme // Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 2014. Vol. 61, no. 9. P. 444–447. https://doi.org/10.3136/nskkk.61.444.

REFERENCES

1. Fasim A., More V.S., More S.S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology.* 2021;69:68-76. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002.

2. Kishimoto M., Nakamura K., Kanemaru K., Tasaki T., Nakamura T., Sato K., et al. Crude enzymes from a *Hericium* edible mushroom isolated in Japan: variability in milk-clotting activity and the ability to coagulate ultra-high-temperature pasteurized milk. *Food Science and Technology Research.* 2018;24(1):139-143. https://doi.org/10.3136/fstr.24.139.

3. Christensen L.F., García-Béjar B., Bang-Berthelsen C.H., Hansen E.B. Extracellular microbial proteases with specificity for plant proteins in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology.* 2022;381:109889. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109889

4. Sommano S.R., Suksathan R., Sombat T., Seehanam P., Sirilun S., Ruksiriwanich W., et al. Novel perspective of medicinal mushroom cultivations: a review case for «Magic» mushrooms. *Agronomy.* 2022;12(12):3185. https://doi.org/10.3390/agronomy12123185.

5. Usman A., Mohammed S., Mamo J. Production, optimization, and characterization of an acid protease from a filamentous fungus by solid-state fermentation. *International Journal of Microbiology.* 2021;190:1-12. https://doi.org/10.1155/2021/6685963.

6. Prabhu G., Bhat D., Bhat R.M., Selvaraj S. A critical look at bioproducts co cultured under solid state fermentation and their challenges and industrial applications. *Waste and Biomass Valorization.* 2022;13(4):3095-3111. https://doi.org/10.1007/s12649-022-01721-0.

7. Petraglia T., Latronico T., Liuzzi G.M., Fanigliulo A., Crescenzi A., Rossano R. Edible mushrooms as source of fibrin(ogen)olytic enzymes: comparison between four cultivated species. *Molecules.* 2022;27(23):8145. https://doi.org/10.3390/molecules27238145.

8. Berger R.G., Ersoy F. Improved foods using enzymes from basidiomycetes. *Processes.* 2022;10(4):726. https://doi.org/10.3390/pr10040726

9. Pallavi P., Avanti K., Pallavi K. Production of milk clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* under solid-state fermentation using mixture of wheat bran and rice bran. *International Journal of Scientific and Research Publications.* 2012;2(10):1-12.

10. Hamrouni R., Molinet J., Mitropoulou G., Kourkoutas Y., Dupuy N., Masmoudi A., et al. From flasks to single used bioreactor: scale-up of solid-state fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum*. *Journal of Environmental Management.* 2019;252(2):109496. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109496.

11. Lebedev L.R., Kosogova T.A., Teplyakova T.V., Kriger A.V., Elchaninov V.V., Belov A.N., et al. Study of technological properties of milk-clotting enzyme from *Irpex lacteus* (*Irpex lacteus* (Fr.) Fr.). *Foods and Raw Materials.* 2016;4(2):58-65. https://doi.org/10.21179/2308-4057-2016-2-58-65.

12. Shamtsyan M., Dmitriyeva T., Kolesnikov B., Denisova N. Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom. *LWT – Food Science and Technology.* 2014;58(2):343-347. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.009.

13. Melanouri E., Dedousi M., Diamantopoulou P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase. *Carbon Resources Conversion.* 2021;5(1):61-70. https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.12.004.

14. Cho N.S., Wilkolazka A.J., Staszczak M., Cho H.Y., Ohga S. The role of laccase from white rot fungi to stress conditions. *Journal of the Faculty of Agriculture.*

2009;54(1):81-83.
https://doi.org/10.5109/14041.

15. Thomas L., Larroche H., Pandeya A. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* 2013;81:146-161.
https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2013.10.013.

16. Salomao R.M., Larissa S.C.S., Leilane B.S., Edson J.C., Mircella M.A., Marne C.V., et al. Teixeira *Pleurotus albidus*: a new source of milk-clotting proteases. *African Journal of Microbiology Research.* 2017;11(17):660-667.
https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8520.

17. Cirium V.C., Vidya C., Rani A., Singh S.A. Production of highly active fungal milk-clotting enzyme by solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology.* 2019;49(9):858-867.
https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1630647.

18. Zagnitko Yu.P. Some physical and chemical properties of enzymic preparations derived from strain V-02 of *Irpex lacteus* FR. Immunology. *Allergology, Infectiology (Section: Fingal Biotechnologies in Medicine and Industry).* 2010;1:60-65.

19. Sato K., Goto K., Suzuki A., Miura T. Characterization of a milk-clotting enzyme from *Hericium erinaceum* and its proteolytic action on bovine caseins. *Food Science and Technology Research.* 2018;24(4):669-676.
https://doi.org/10.3136/fstr.24.669.

20. Kalunyants K.A., Smirnova T.A., Denisov V.M., Dzhalmukhamedova R., Sharapov A.P., Shurupova N.P. *Method for purifying milk-curdling enzyme preparation from Mucor, Pusillus, Mucor michei.* Certificate of authorship, no. 962303; 1982. (In Russian).

21. Minakov D.V., Urazova Ya.V., Minakova A.A. Screening and research of producersof milk-coagulating enzymes among cultures of higher basidiomycetes. *Polzunovskii vestnik.* 2022;(3):173-180.
https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2022.03.024.
EDN: LFMEJT.

22. Mamo J., Getachew P., Kuria M.S., Assefa F. Application of milk-clotting protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for danbo cheese production. *Journal of Food Quality.* 2020;4:1-12.
https://doi.org/10.1155/2020/8869010.

23. Kumura H., Saito C., Taniguchi Y., Machiya T., Takahashi Y., Kobayashi K., et al. Adjunctive application of solid-state culture products from *Aspergillus oryzae* for semihard cheese. *Advances in Dairy Research.* 2017;5(3):188.
https://doi.org/10.4172/2329-888X.1000188.

24. Musoni M., Destain J., Thonart P., Bahama J., Delvigne F. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment.* 2015;19(4):430-442.

25. Myagkonosov D.S., Abramov D.V., Delitskaya I.N., Ovchinnikova E.G. Proteolytic activity of milk-clotting enzymes of different origin. *Pishchevye sistemy = Food Systems.* 2022;5(1):47-54. (In Russian).
https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54.
EDN: FKAOJB.

26. Kishimoto M., Nakamura K., Kanemaru K., Tasaki T., Nakamura T., Sato K., et al. Crude enzymes from a *Hericium* edible mushroom isolated in Japan: variability in milk-clotting activity and the ability to coagulate ultra-high-temperature pasteurized milk. *Food Science and Technology Research.* 2018;24(1):139-143.
https://doi.org/10.3136/fstr.24.139.

27. Nakamura K., Kobayashi N., Tanimoto M. Screening of edible mushrooms producing milk-clotting enzyme. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* 2014;61(9):444-447.
https://doi.org/10.3136/nskkk.61.444.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Минаков Денис Викторович,
к.б.н., доцент,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61,
Российская Федерация;
доцент,
Бийский технологический институт –
филиал Алтайского государственного технического
университета им. И.И. Ползунова,
659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27,
Российская Федерация,
✉minakovd-1990@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-4286-7783

Уразова Яна Валерьевна,
аспирант,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61,
Российская Федерация;
преподаватель,
Бийский технологический институт –
филиал Алтайского государственного технического

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Denis V. Minakov,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Altai State University,
61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,
Russian Federation;
Associate Professor,
Biysk Institute of Technology (branch)
of the Polzunov Altai State Technical University,
27, Trofimov St., Biysk, 659323,
Russian Federation,
✉minakovd-1990@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-4286-7783

Yana V. Urazova,
Postgraduate Student,
Altai State University,
61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,
Russian Federation;
Lecturer,
Biysk Institute of Technology (branch)
of the Polzunov Altai State Technical University,

университета им. И.И. Ползунова,
659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27,
Российская Федерация,
urazova. iav@bti.secna.ru
https://orcid.org/0000-0002-6847-8487

Базарнова Наталья Григорьевна,
д.х.н., профессор,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61,
Российская Федерация,
bazarnova@chem.asu.ru
https://orcid.org/0000-0002-4539-2744

Тихонов Сергей Леонидович,
д.т.н., профессор,
Уральский государственный экономический университет,
620000, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта/Народной воли, 62/45, Российская Федерация,
tihonov75@bk.ru
https://orcid.org/0000-0001-5841-1791

Минакова Марианна Викторовна,
магистрант, инженер,
Бийский технологический институт –
филиал Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова,
659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27, Российская Федерация,
marianna.minakova@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-8618-7085

27, Trofimov St., Biysk, 659323,
Russian Federation,
urazova. iav@bti.secna.ru
https://orcid.org/0000-0002-6847-8487

Natalya G. Bazarnova,
Doctor of Chemistry, Professor,
Altai State University,
656049, Barnaul, Lenin Ave., 61,
Russian Federation,
bazarnova@chem.asu.ru
https://orcid.org/0000-0002-4539-2744

Sergei L. Tikhonov,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Ural State University of Economics,
62/45, 8 Marta/Narodnoi Voli St., Yekaterinburg,
620000, Russian Federation,
tihonov75@bk.ru
https://orcid.org/0000-0001-5841-1791

Marianna V. Minakova,
Master Student, Engineer,
Biysk Institute of Technology (branch)
of the Polzunov Altai State Technical University,
27, Trofimov St., Biysk, 659323,
Russian Federation,
marianna.minakova@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-6692-4482

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.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

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.

Информация о статье

Поступила в редакцию 30.03.2023.
Одобрена после рецензирования 15.06.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

Information about the article

The article was submitted 30.03.2023.
Approved after reviewing 15.06.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 57.02:579.6
EDN: NQHWYM
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-350-358

Сорт-штаммовая специфичность взаимодействия *Bacillus subtilis* с растениями *Phaseolus vulgaris* L. при солевом стрессе

О.В. Маркова✉*, С.Р. Гарипова*, Л.И. Пусенкова**

*Уфимский университет науки и технологий, г. Уфа, Российская Федерация
**Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа, Российская Федерация

Аннотация. *Эффективность инокуляции сельскохозяйственных культур ростстимулирующими бактериями может зависеть от сорта растений и условий среды. Проанализированы реакции трехнедельных растений сортов Уфимская и Золотистая на инокуляцию штаммами 26Д и 10-4 в норме и при стрессе (1% NaCl 48 ч). Сорт Золотистая формировал меньшую биомассу и площадь листьев, но превосходил сорт Уфимская по содержанию хлорофилла и оводненности корней, на стресс реагировал снижением содержания фотосинтетических пигментов и уменьшением оводненности корней. Инокуляция способствовала сохранению этих показателей на уровне нестрессированных растений, при этом положительный эффект штамма 26Д выразился во влиянии на состав пигментов, а штамма 10-4 – в оводненности корней. Сорт Уфимская при стрессе улучшал водный статус корней, на который инокуляция оказала слабое или негативное воздействие, но снижение уровня синтетических пигментов при стрессе было восполнено за счет инокуляции обоими штаммами. По биомассе трехнедельных растений выявлено, что сорт Золотистая положительно отзывался на инокуляцию обоими штаммами как в норме, так и при стрессе, а сорт Уфимская в норме негативно реагировал на инокуляцию штаммом 26Д, но при стрессе эффект от инокуляции обоими штаммами был положительным. Содержание малонового диальдегида в корнях инокулированных растений обоих сортов снижалось по сравнению с неинокулированным контролем в норме и при стрессе по сравнению со стресс-индуцированным контролем. Выявленные различия в реакциях растений на инокуляцию служат базой для дальнейшего анализа эффективных/неэффективных сорт-штаммовых комбинаций симбиотических партнеров.*

Ключевые слова: *Bacillus subtilis, Phaseolus vulgaris L., засоление, малоновый диальдегид, фотосинтетические пигменты*

Финансирование. *Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-24-00602.*

Для цитирования: Маркова О.В., Гарипова С.Р., Пусенкова Л.И. Сорт-штаммовая специфичность взаимодействия *Bacillus subtilis* с растениями *Phaseolus vulgaris* L. при солевом стрессе // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 350–358. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-350-358. EDN: NQHWYM.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Variety-strain interaction specificity of *Bacillus subtilis* with salt-stressed *Phaseolus vulgaris* L. plants

Oksana V. Markova✉*, Svetlana R. Garipova*, Ludmila I. Pusenkova**

*Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russian Federation
** Bashkiria Research Agricultural Institute, Ufa Federal Research Center RAS, Ufa, Russian Federation

Abstract. *The effectiveness of crop inoculation using growth-stimulating bacteria can depend on the plant variety and environmental conditions. The reactions of three-week-old plants of the Ufimskaya and Zolotistaya green bean varieties to inoculation with strains 26D and 10-4 in normal conditions and under stress (1% NaCl 48 h) were analysed. Although the Zolotistaya variety formed less biomass and leaf area, it surpassed the Ufimskaya variety in terms of chlorophyll and root water content, as well as reacting to stress by reducing the content of photosynthetic pigments and root water content. Inoculation contributed to the preservation of these indicators at the level of non–stressed*

© Маркова О.В., Гарипова С.Р., Пусенкова Л.И., 2023

plants: the positive effect of strain 26D was expressed in the effect on the composition of pigments, while that of strain 10-4 was expressed in the hydration of roots. Under stress, the Ufinskaya variety improved the water status of the roots, on which inoculation had a weak or negative effect; however, the decrease in the level of synthetic pigments under stress was compensated by inoculation with both strains. According to the biomass of three-week-old plants, the Zolotistaya variety was shown to respond positively to inoculation with both strains both normally and under stress, while the Ufimskaya variety tended to react negatively to inoculation with strain 26D; under stress, the effect of inoculation with both strains was positive. Compared with the stress-induced control, the malondialdehyde content in the roots of inoculated plants of both varieties decreased in comparison with that of the uninoculated control both in normal conditions and under stress. The revealed differences in plant reactions to inoculation serve as a basis for further analysis of the effectiveness of variety-strain combinations of symbiotic partners.

Keywords: *Bacillus subtilis, Phaseolus vulgaris* L.*, salinization, malondialdehyde, photosynthetic pigments*

Funding. *The study was financially supported by the Russian Science Foundation grant 23-24-00602.*

For citation: Markova O.V., Garipova S.R., Pusenkova L.I. Variety-strain interaction specificity of *Bacillus subtilis* with salt-stressed *Phaseolus vulgaris* L. plants. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(3):350-358. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-350-358. EDN: NQHWYM.

ВВЕДЕНИЕ

Растения имеют целый арсенал возможностей противодействия неблагоприятным факторам среды [1]. Вместе с тем симбиоз с эндофитными бактериями повышает их адаптивный потенциал, стимулируя рост и увеличивая устойчивость к стрессам [2–4]. Механизмы влияния бактерий на растения разнообразны [5–7], реакции сортов сельскохозяйственных культур на инокуляцию разными штаммами специфичны [8–10] и могут зависеть от степени стресса [11].

На основе многолетних данных установлено, что сорт фасоли Уфимская характеризовался более высоким коэффициентом адаптированности, проявлял меньшую вариабельность урожая в контрастных условиях среды по сравнению с сортом Золотистая [12]. В полевых условиях инокуляция этих сортов штаммами *Bacillis subtilis* 26Д и 10-4 приводила как к эффективному, так и неэффективному симбиозу, оцениваемому по конечной семенной продуктивности [13, 14]. Для прогноза характера симбиотических взаимоотношений эндофитных бактерий с растениями важно обладать знанием механизмов действия эндофитных штаммов на растения и пониманием того, какие свойства сортов являются лимитирующими, могут ли они быть восполнены за счет физиологической активности инокулируемых штаммов как в нормальных условиях, так и при воздействии стресса. В качестве предварительного показателя эффективности эндофитного симбиоза было предложено учитывать степень снижения уровня малонового диальдегида (МДА) в корнях инокулированных растений фасоли по отношению к неинокулированным [15].

Есть представление о том, что к разным видам стресса растения проявляют сходные физиолого-биохимические реакции [1]. Ответ растений на инокуляцию при засолении [6, 7, 10, 11] может в определенной степени служить моделью для анализа эффективности взаимодействия штаммов эндофитных бактерий с растениями в стрессовых условиях. Ранее при изучении влияния суточной экспозиции двухнедельных растений сорта Золотистая в 2%-м растворе NaCl на ростовые и биохимические показатели инокулированных данными штаммами растений было выявлено, что одним из механизмов повышения жизнеспособности растений являлась лигнификация клеточных стенок, которая была в большей степени выражена у растений, инокулированных штаммом 10-4, по сравнению со штаммом 26Д, и это совпадало с улучшением ряда ростовых показателей недельных растений как в норме, так и при стрессе [16]. Особенности взаимодействия данных штаммов с растениями сорта Уфимская в условиях засоления ранее не были изучены. В данном исследовании была поставлена цель – сравнить физиолого-биохимические показатели 2-х сортов фасоли (Золотистая и Уфимская) в ответ на инокуляцию штаммами *B. subtilis* 26Д и 10-4 в нормальных условиях и в условиях менее интенсивного (1% NaCl), но более продолжительного (48 ч) стресса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили на растениях фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L.) районированных сортов Золотистая и Уфимская. Для инокуляции семян использовали эндофитные бактерии, полученные из коллекции Башкирского научно-исследовательского института сельского хозяйства – обособленного структурного подразделения Уфимского федерального исследовательского центра РАН: штамм *B. subtilis* 26Д (ВКПМ № 016-02-2491-1), входящий в состав препарата «Фитоспорин-М» (НВП «Башинком», Россия), и штамм *B. subtilis* 10-4 (ВКПМ В-12988). Для приготовления бактериального препарата использовали суспензии споровых культур бактерий, выращенных на мясо-пептонном агаре при температуре 37 °С. Плотность клеток бактерий в суспензии нормировали по стандарту мутности Тарасевича: для *B. subtilis* 26Д использовали титр 10^8 КОЕ/мл по рекомендации производителя, для *B. subtilis* 10-4 – титр 10^5 КОЕ/мл по эффективности проведенных ранее лабораторных и полевых опытов.

Поверхность семян промывали водопроводной водой с детергентом, трижды ополаскивали дистиллированной водой, затем поверхностно стерилизовали в 96%-м этаноле в течение 10 мин, ополаскивали дистиллированной водой. Инокуляцию штаммами 26Д и 10-4 проводили путем замачивания семян в суспензии бактериальных клеток в течение 1 ч в термостате при температуре 28 °С, контролем служили необработанные семена, которые замачивали в стерильной воде. Затем семена переносили в кюветы 14х10 см на увлажненный песок (80% от полной влагоемкости) и проращивали в термостате при температуре 22–24 °С. На седьмые сутки однородные проростки высаживали

в пластиковые сосуды объемом 250 мл, заполненные стерильным песком. На дно сосудов в качестве дренажа помещали слой гальки объемом 50 г. Влажность субстрата поддерживали на уровне 80% от полной влагоемкости. Растения выращивали в течение 2-х недель при температуре 23–25 °С и 12-часовом естественном фотопериоде. Трехнедельные растения на 48 ч подвергали засолению 1%-м раствором NaCl.

Содержание фотосинтетических пигментов в листьях растений определяли в спиртовом экстракте: 0,2 г растительного материала погружали в 10 мл 96%-го этанола и оставляли в темноте на 1 сутки. Оптическую плотность спиртового раствора измеряли на спектрофотометре ПЭ-53008 (ГК «Экрос», Россия) при длинах волн 665, 649 и 440,5 нм, соответствующих максимумам поглощения хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и каротиноидов соответственно, и выражали в мг/л сырой массы. Степень оксидативного стресса в корнях растений фасоли определяли по накоплению МДА методом спектрофотометрии при длинах волн 540 и 590 нм, оценивая концентрацию продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой в вытяжках трихлоруксусной кислоты, и выражали в нМ/г сырой массы [17]. Для определения содержания воды в растениях отбирали пробы побегов и корней растений, высушивали их до постоянной массы с периодическим взвешиванием [18]. Обезвоживание на воздухе проводили в течение 4 ч, высушивание осуществляли в сушильном шкафу, нагретом до температуры 100–105 °С. Рассчитывали общую оводненность (W), водоудерживающую способность (R) в пробах, используя формулы:

$$W = 100\cdot(M - M2)/M,$$
$$R = 100\cdot((M - M2) - (M - M1))/M = 100\cdot(M1 - M2)/M,$$

где M – масса свежей пробы; M1 – масса пробы спустя сутки; M2 – масса пробы после высушивания.

Статическую обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2010 и STATISTICA 8.0. Биологические повторы представляли собой анализ 4-х растений, с каждого из которых анализировали по 2 листа, биохимические анализы осуществляли в 3-кратной повторности для каждого варианта опыта. Достоверность различий определяли по t-тесту (p<0,05).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В норме и при стрессе сорта фасоли по-разному взаимодействовали с бактериями (рис. 1). В норме инокуляция штаммом 26Д сорта Золотистая привела к увеличению массы растений в 2,3 раза, тогда как при инокуляции этим штаммом сорта Уфимская масса трехнедельных растений была на 21% меньше, чем у контрольных растений. При стрессе оба штамма 10-4 и 26Д способствовали увеличению массы растений обоих сортов от 17 до 69%. Сопоставляя данные по массе инокулированных трехнедельных растений с результатами семенной продуктивности в полевых опытах [13, 14], можно отметить следующие совпадения: во-первых, сорт Золотистая положительно отзывался на инокуляцию обоими штаммами как в норме, так и при стрессе; во-вторых, сорт Уфимская положительно реагировал на обработку бактериями только при стрессе, а также несовпадения: в полевых условиях инокуляция сорта Уфимская штаммом 26Д была неэффективной, тогда как в данном эксперименте эта закономерность наблюдалась только в нормальных условиях.

Анализ других ростовых параметров 15-дневных растений показал, что при взаимодействии с сортом Золотистая оба штамма стимулировали на 15% рост побегов и увеличение на 65% площади листьев по сравнению с контролем (рис. 2). При взаимодействии с сортом Уфимская штамм 10-4 способствовал формированию более низкорослых растений, но с большей (на 9%), чем в контроле, площадью листьев. Таким образом, по данным морфометрическим показателям не прослеживались выраженные сортоспецифические взаимодействия, которые обнаружились неделю спустя по биомассе растений (см. рис. 1).

Следует отметить, что в варианте инокуляции сорта Уфимская штаммом 10-4 в полевых экспериментах также отмечено формирование более низкорослых растений, что, возможно, связано с усилением энергии роста в

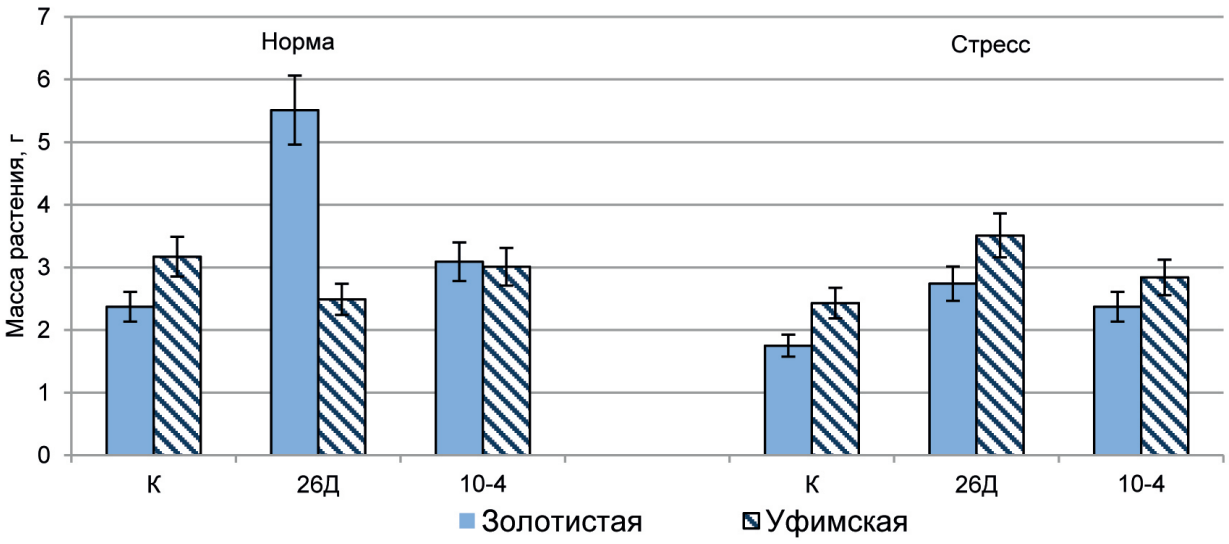


Рис. 1. Влияние штаммов *B. subtilis* на массу 21-суточных растений фасоли

Fig. 1. Effect of *B. subtilis* strains on the weight of 21-day-old bean plants

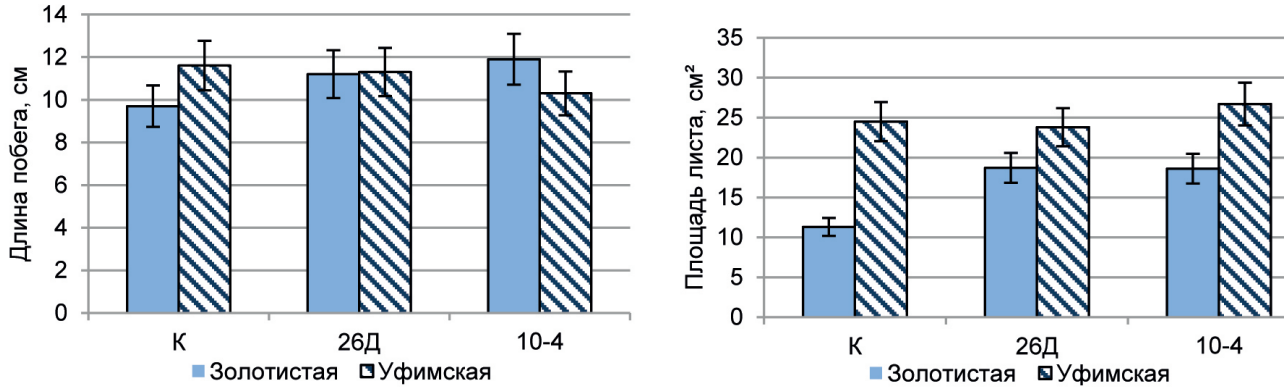


Рис. 2. Влияние штаммов *B. subtilis* 26Д и 10-4 на длину побега и площадь листьев 15-суточных растений фасоли

Fig. 2. Effect of *B. subtilis* 26D and 10-4 strains on shoot length and leaf area of 15-day-old bean plants

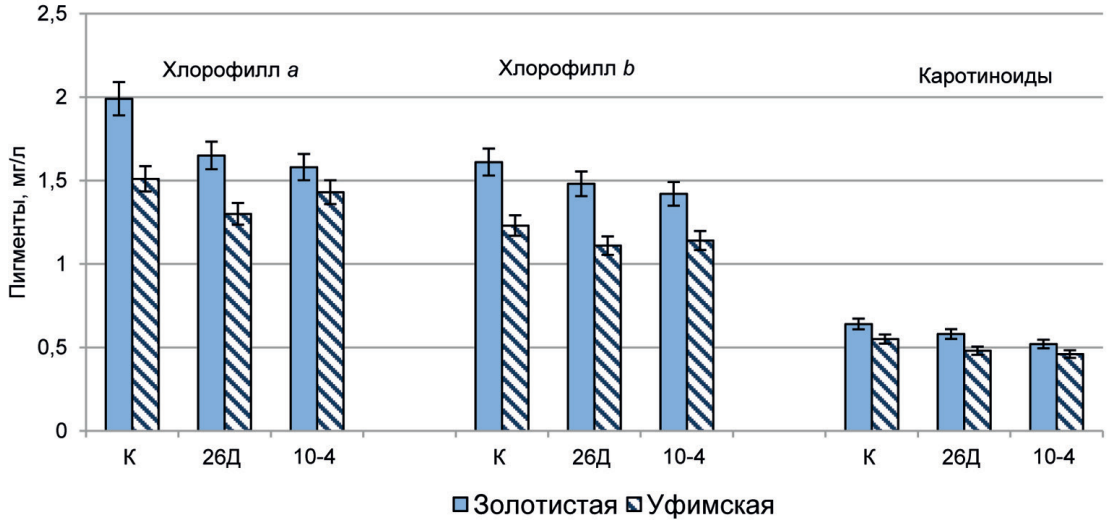


Рис. 3. Влияние штаммов *B. subtilis* на содержание фотосинтетических пигментов 21-суточных растений фасоли в нормальных условиях

Fig. 3. Effect of *B. subtilis* strains on the content of photosynthetic pigments in 21-day-old bean plants under normal conditions

направлении увеличения длины главного корня еще на стадии проростков [13] и также с большей (на 8%), чем в контроле, площадью листьев на 40-й день от посева [14]. Таким образом, данная особенность сорт-штаммовых взаимодействий воспроизводилась ранее как в модельных, так и в полевых условиях.

Анализ содержания фотосинтетических пигментов в листьях показал, что в растениях сорта Уфимская оно было на 24% меньше, чем у сорта Золотистая (см. рис. 2). Следует отметить, что при этом площадь листьев сорта Уфимская вдвое превосходила таковую у сорта Золотистая (см. рис. 2). В инокулированных вариантах обоих сортов отмечено уменьшение содержания фотосинтетических пигментов (рис. 3), при этом в растениях сорта Золотистая, вероятно, оно компенсировалось увеличением площади листьев на 65% к контролю (см. рис. 2), тогда как растения сорта Уфимская, инокулированные штаммом 26Д, не имели такого преимущества. При засолении содержание хлорофилла *a* и каротиноидов в листьях обоих сортов уменьшилось от 15 до 40% по сравнению с нормальными условиями, но в инокулированных вариантах оно сохранялось таким же, как у нестрессированных растений (рис. 4). Можно предположить, что вклад бактерий в поддержание целостности фотосинтетической системы состоял в увеличении площади листьев, возможно, за счет развития сосудистой ткани листа или лигнификации клеточных стенок, показанной в работе [16].

Оводненность и водоудерживающая способность были измерены и в корнях, и в побегах. Но, в отличие от значений этих показателей в побегах, которые статистически не отличались в разных вариантах опыта (данные не представлены), в корнях различия между вариантами опыта были существенными (рис. 5). В нормальных условиях оводненность корней сорта Золотистая (85%) была выше, чем у сорта Уфимская (63%). Но в условиях стресса этот показатель изменился противоположным образом, что указывает на высокую резистентность сорта Уфимская к неблагоприятным факторам среды и отсутствие этого свойства у сорта Золотистая. При этом в нормальных условиях инокулированные растения сорта Золотистая имели 10%-е уменьшение оводненности в корнях по сравнению с контролем, а растения сорта Уфимская реагировали на инокуляцию увеличением этого показателя от 21 до 37%. При стрессе, напротив, на фоне пониженной оводненности в контроле у сорта

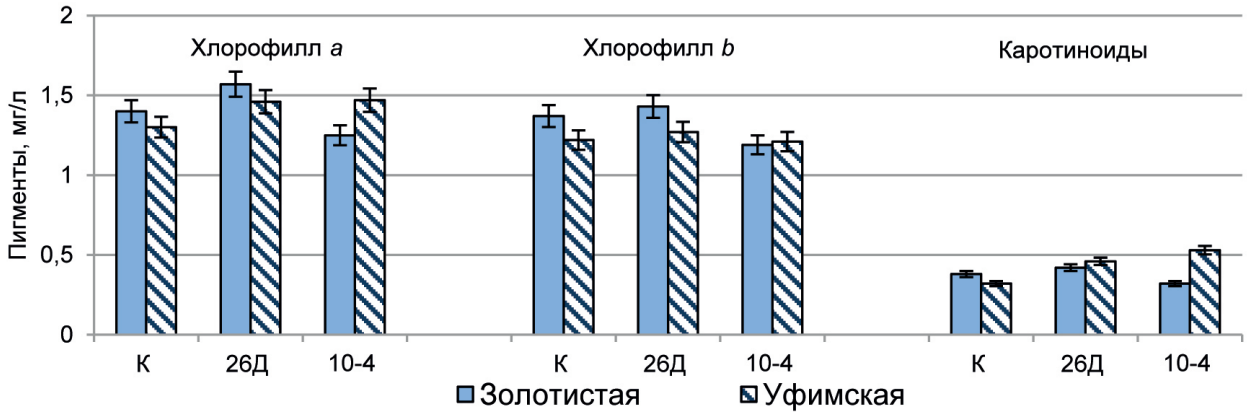


Рис. 4. Влияние штаммов *B. subtilis* на содержание фотосинтетических пигментов 21-суточных растений фасоли при стрессе

Fig. 4. Effect of *B. subtilis* strains on the content of photosynthetic pigments in 21-day-old bean plants under stress

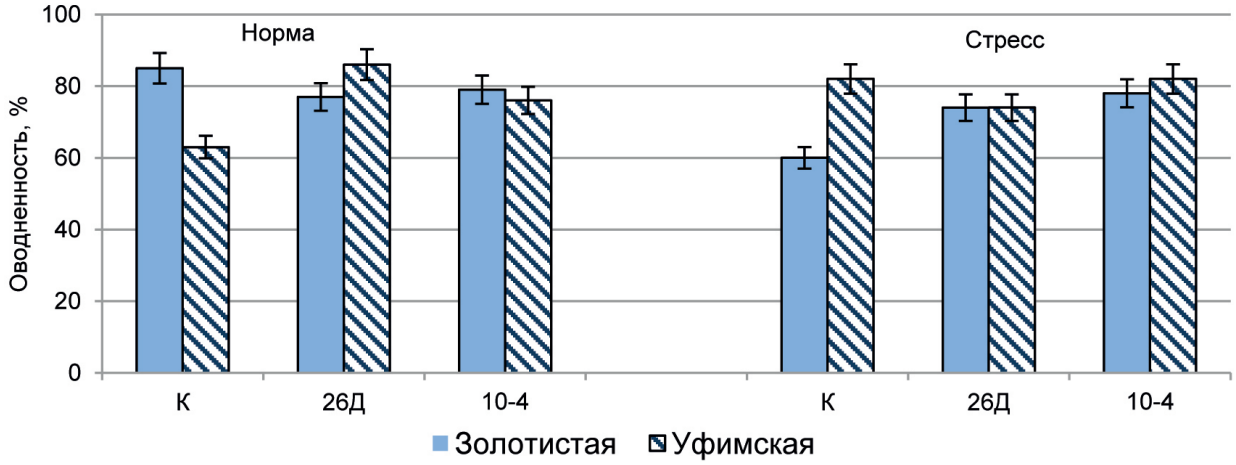


Рис. 5. Оводненность в корнях растений фасоли при инокуляции штаммами *B. subtilis* 26Д и 10-4 в нормальных условиях и при стрессе

Fig. 5. Water content in the roots of bean plants inoculated with *B. subtilis* 26D and 10-4 strains under normal conditions and under stress

Золотистая оба инокулированных варианта имели более высокие значения оводненности. На фоне более высокой оводненности корня в контроле сорта Уфимская инокуляция штаммом 26Д привела к 10%-му снижению значения этого показателя. Таким образом, обладая разной степенью резистентности к фактору засоления, сорт Золотистая повышал оводненность корней при взаимодействии с обоими штаммами бактерий, а сорт Уфимская уменьшал содержание свободной влаги при инокуляции штаммом 26Д.

Что касается водоудерживающей способности (рис. 6), то в нормальных условиях сорт Золотистая превосходил по этому показателю сорт Уфимская. Инокулированные варианты растений сорта Золотистая мало отличались от контрольных. Инокуляция обоими штаммами сорта Уфимская способствовала повышению этого показателя на 6% от контроля. При стрессе наблюдалась сорт-штаммовая специфичность: при инокуляции сорта Золотистая штаммом 26Д происходило повышение на 6% водоудерживающей способности по сравнению с контролем, а при инокуляции штаммом 10-4, напротив, снижение на 4%. Это при том, что содержание воды в обоих вариантах инокуляции увеличивалось (см. рис. 5). Инокуляция сорта Уфимская, обладающего при стрессе высокой водоудерживающей способностью, приводила к снижению показателя от 4 до 9% по сравнению с контролем (см. рис. 6).

Различия между водным статусом инокулированных сортов в норме и при стрессе можно объяснить, если обратиться к полученным ранее сведениям о влиянии штаммов на формирование архитектуры корневой системы разных сортов: по длине главного корня 6-суточных проростков сорт Уфимская вдвое превосходил сорт Золотистая, инокуляция сорта Золотистая штаммом 26Д и особенно штаммом 10-4 способствовала равномерному увеличению как длины главного, так и всех корней растений [13]. По-видимому, такая архитектура корня позволила повысить от 23 до 30% по сравнению с контролем оводненность корня инокулированных растений сорта Золотистая (см. рис. 5). Сорт Уфимская на ранних стадиях развития реагировал на инокуляцию штаммом 10-4 увеличением длины главного корня,

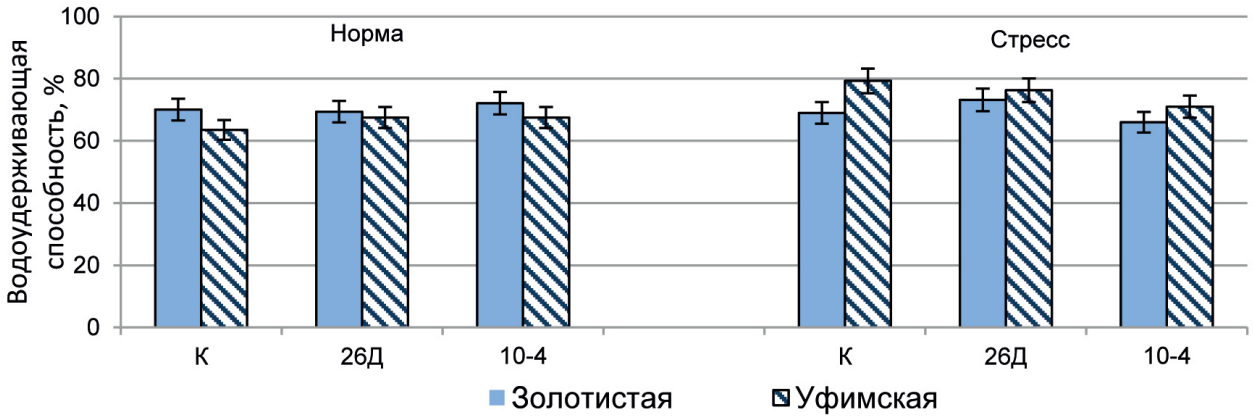


Рис. 6. Водоудерживающая способность в корнях растений фасоли при инокуляции штаммами *B. subtilis* 26Д и 10-4 в нормальных условиях и при стрессе

Fig. 6. Water-retaining capacity in the roots of bean plants inoculated with *B. subtilis* 26D and 10-4 strains under normal conditions and under stress

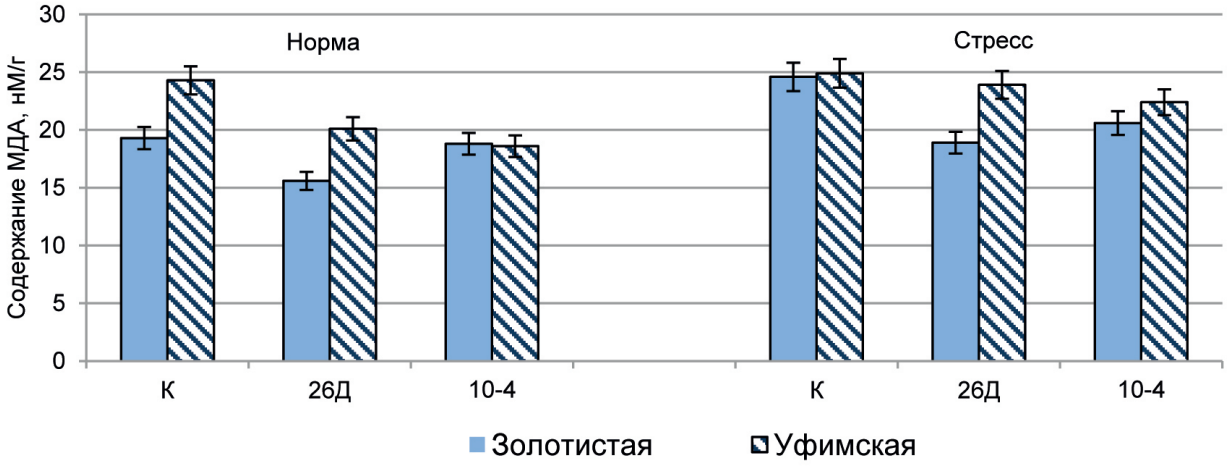


Рис. 7. Влияние штаммов *B. subtilis* на содержание малонового диальдегида в корнях 21-суточных растений фасоли

Fig. 7. Effect of *B. subtilis* strains on the content of malon dialdehyde in the roots of 21-day-old bean plants

сохраняя на уровне контроля длину и количество всех корней, тогда как инокуляция штаммом 26Д вызвала преимущественный рост боковых корней, сокращая рост главного корня [13], что в норме привело к увеличению оводненности, а при стрессе – к ее уменьшению в корнях (см. рис. 5).

Способность *B. subtilis* обеспечивать повышенное содержание воды в листьях растений фасоли без ущерба для скорости фотосинтеза была отмечена в работе [19]. В исследовании влияния предпосевной обработки пшеницы (яровой и озимой) штаммом *B. subtilis* 10-4 на рост было также выявлено различное воздействие на водный статус растений в зависимости от стратегии разных экотипов адаптации к стрессу [20], что согласуется с нашими исследованиями.

Процесс адаптации к любому стрессу сопровождается необходимостью восстановления редокс-баланса, вызванного накоплением активных форм кислорода, в удаление которых могут внести существенный вклад эндофитные бактерии благодаря активизации ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы, и конечным результатом этой работы может служить содержание МДА [3, 7, 15]. В корнях инокулированных растений обоих сортов концентрация МДА снижалась по сравнению с неинокулированным контролем в норме и на фоне засоления по сравнению со стресс-индуцированным контролем (рис. 7). Наибольшее снижение по сравнению с каждым из контролей (в норме и при стрессе) отмечено для сорта Золотистая при инокуляции штаммом 26Д и для сорта Уфимская при инокуляции штаммом 10-4, т.е. для тех сорт-штаммовых комбинаций, которые были наиболее эффективными в продукционном процессе в полевых условиях 2018 года [13], что свидетельствует в пользу выдвинутого ранее предположения [15].

ВЫВОДЫ

Сорт-штаммовая специфичность взаимодействия растений фасоли с эндофитными штаммами *B. subtilis*, выявленная в полевых условиях, подтвердилась по показателю массы трехнедельных растений в модельном эксперименте (штамм 26Д стимулировал рост сорта Золотистая и ингибировал рост сорта Уфимская). При этом длина побега и площадь листьев двухнедельных

растений указывали на стимулирующее влияние бактерий в любых вариантах бактериальных обработок.

Сорт-штаммовые отличия в содержании фотосинтетических пигментов обнаружены только в условиях стресса. Сорта отличались по накоплению/убыванию каротиноидов в ответ на инокуляцию, а штаммы дифференцированно влияли на количество зеленых пигментов.

Сорта отличались по уровню оводненности и водоудерживающей способности. Инокулированные растения сорта Золотистая получили преимущество по сравнению с контролем по оводненности при стрессе, при этом штаммы по-разному влияли на уровень водоудерживающей способности. Сорт Уфимская положительно реагировал на бактеризацию только в оптимальных условиях, штамм 26Д уменьшал оводненность и водоудерживающую способность.

Содержание МДА в корнях инокулированных растений обоих сортов снижалось по сравнению с неинокулированным контролем в норме и на фоне засоления по сравнению со стресс-индуцированным контролем.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Munns R., Millar A.H. Seven plant capacities to adapt to abiotic stress // Journal of Experimental Botany. 2023. Vol. 74, no. 15. P. 4308–4323. https://doi.org/10.1093/jxb/erad179.

2. Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве // Экологическая генетика. 2019. Т. 17. N 1. С. 19–32. https://doi.org/10.17816/ecogen17119-32. EDN: KUMEWN.

3. Salvi P., Mahawar H., Agarrwal R., Kajal, Gautam V., Deshmukh R. Advancement in the molecular perspective of plant-endophytic interaction to mitigate drought stress in plants // Frontiers in Microbiology. 2022. Vol. 13. P. 981355. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.981355.

4. Zhang Y., Yu X., Zhang W., Lang D., Zhang X., Cui G., et al. Interactions between endophytes and plants: beneficial effect of endophytes to ameliorate biotic and abiotic stresses in plants // Journal of Plant Biology. 2019. Vol. 62. P. 1–13. https://doi.org/10.1007/s12374-018-0274-5.

5. Bhat M.A., Mishra A.K., Jan S., Bhat M.A., Kamal M.A., Rahman S., et al. Plant growth promoting rhizobacteria in plant health: a perspective study of the underground interaction // Plants. 2023. Vol. 12, no. 3. P. 629. https://doi.org/10.3390/plants12030629.

6. Zhang Y., Cui G., Zhang W., Lang D., Li Z., Zhang X. *Bacillus* sp. G2 improved the growth of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. related to antioxidant metabolism and osmotic adjustment // Acta Physiologiae Plantarum. 2021. Vol. 43. P. 152. https://doi.org/10.1007/s11738-021-03318-x.

7. Zhou Y., Sang T., Tian M., Jahan M.S., Wang J., Li X., et al. Effects of *Bacillus cereus* on photosynthesis and antioxidant metabolism of cucumber seedlings under salt stress // Horticulturae. 2022. Vol. 8, no. 5. P. 463. https://doi.org/10.3390/horticulturae8050463.

8. Курамшина З.М., Хайруллин Р.М., Смирнова Ю.В. Сортовая отзывчивость *Triticum aestivum* L. на инокуляцию клетками эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* // Российская сельскохозяйственная наука. 2019. N 6. С. 3–6. https://doi.org/10.31857/S2500-2627201963-6.

9. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Маркова О.В., Уразбахтина Н.А., Хайруллин Р.М. Комплексная биологическая активность *in vitro* эндофитных бактерий, выделенных из клубеньков гороха и фасоли // Известия Уфимского научного центра РАН. 2015. N 4-1. С. 25–28. EDN: UXPIFX.

10. Fan D., Subramanian S., Smith D.L. Plant endophytes promote growth and alleviate salt stress in Arabidopsis thaliana // Scientific Reports. 2020. Vol. 10, no. 1. P. 12740. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69713-5.

11. Song P., Zhao B., Sun X., Li L., Wang Z., Ma C., et al. Effects of *Bacillus subtilis* HS5B5 on maize seed germination and seedling growth under NaCl stress conditions // Agronomy. 2023. Vol. 13. P. 1874. https://doi.org/10.3390/agronomy13071874 .

12. Маркова О.В., Гарипова С.Р. Адаптивный потенциал сортов фасоли *Phaseolus vulgaris* L., возделываемых в условиях Южного Предуралья // Проблемы агрохимии и экологии. 2020. N 4. С. 40–43. https://doi.org/10.26178/AE.2020.78.87.007. EDN: ZADIIV.

13. Гарипова С.Р., Шаяхметова А.С., Ласточкина О.В., Федорова К.А., Пусенкова Л.И. Влияние инокуляции растений фасоли эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* на рост проростков в модельных опытах и продуктивность в условиях Южного Предуралья // Агрохимический вестник. 2020. N 6. С. 48–53. https://doi.org/10.33184/dokbsu-2021.3.2 EDN: YUTLRK.

14. Иксанова М.А., Гарипова С.Р. Анализ фенологии, роста и продуктивности фасоли сортов Уфимская и Золотистая при инокуляции эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* в условиях Предуралья // Доклады Башкирского университета. 2021. Т. 6. N 3. С. 152–157. https://doi.org/10.33184/dokbsu-2021.3.2 EDN: LPSSBT.

15. Garipova S.R., Markova O.V., Fedorova K.A., Dedova M.A., Iksanova M.A., Kamaletdinova A.A., et al. Malondialdehyde and proline content in bean cultivars following the inoculation with endophytic bacteria // Acta Physiologiae Plantarum. 2022. Vol. 44, no. 7. P. 89. https://doi.org/10.1007/s11738-022-03427-1.

16. Lastochkina O., Allagulova C., Fedorova K., Baymiev A., Koryakov I., Aliniaeifard S., et al. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damages // Journal of Plant Physiology. 2021. Vol. 263. P. 153462. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153462.

17. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1968. Vol. 125, no. 1. P. 189–198. https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1

18. Реут А.А., Денисова С.Г. Устойчивость декоративных травянистых растений к изменяющимся условиям окружающей среды // Экобиотех. 2019. Т. 2. N 4. С. 456–461.

https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-4-456-461. EDN: KDNNGA.

19. De Lima B.C., Moro A.L., Santos A.C.P., Bonifacio A., Araujo A.S.F., de Araujo F.F. *Bacillus subtilis* ameliorates water stress tolerance in maize and common bean // Journal of Plant Interactions. 2019. Vol. 14, no. 1. P. 432–439. https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1645896.

20. Lubyanova A.R., Allagulova C.R., Lastochkina O.V. The effects of seed pretreatment with endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on the water balance of spring and winter wheat seedlings under short-time water deficit // Plants. 2023. Vol. 12, no. 14. P. 2684. https://doi.org/10.3390/plants12142684.

REFERENCES

1. Munns R., Millar A.H. Seven plant capacities to adapt to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany.* 2023;74(15):4308-4323. https://doi.org/10.1093/jxb/erad179.

2. Vasileva E.N., Akhtemova G.A., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A. Endophytic microorganisms in fundamental research and agriculture. *Ekologicheskaya genetika = Ecological Genetics.* 2019;17(1):19-32. (In Russian). https://doi.org/10.17816/ecogen17119-32. EDN: KUMEWN.

3. Salvi P., Mahawar H., Agarrwal R., Kajal, Gautam V., Deshmukh R. Advancement in the molecular perspective of plant-endophytic interaction to mitigate drought stress in plants. *Frontiers in Microbiology.* 2022;13:981355. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.981355.

4. Zhang Y., Yu X., Zhang W., Lang D., Zhang X., Cui G., et al. Interactions between endophytes and plants: beneficial effect of endophytes to ameliorate biotic and abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Biology.* 2019;62:1-13. https://doi.org/10.1007/s12374-018-0274-5.

5. Bhat M.A., Mishra A.K., Jan S., Bhat M.A., Kamal M.A., Rahman S., et al. Plant growth promoting rhizobacteria in plant health: a perspective study of the underground interaction. *Plants.* 2023;12(3):629. https://doi.org/10.3390/plants12030629.

6. Zhang Y., Cui G., Zhang W., Lang D., Li Z., Zhang X. *Bacillus* sp. G2 improved the growth of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. related to antioxidant metabolism and osmotic adjustment. *Acta Physiologiae Plantarum.* 2021;43:152. https://doi.org/10.1007/s11738-021-03318-x.

7. Zhou Y., Sang T., Tian M., Jahan M.S., Wang J., Li X., et al. Effects of *Bacillus cereus* on photosynthesis and antioxidant metabolism of cucumber seedlings under salt stress. *Horticulturae.* 2022;8(5):463. https://doi.org/10.3390/horticulturae8050463.

8. Kuramshina Z.M., Khairullin R.M., Smirnova Y.V. The responsiveness of *Triticum aestivum* L. variety for inoculation by cells of endophytic strains *Bacillus subtilis. Rossiiskaya sel'skokhozyaistvennaya nauka = Russian Agricultural Sciences.* 2019;(6):3-6. (In Russian). https://doi.org/10.31857/S2500-2627201963-6.

9. Garipova S.R., Garifullina D.V., Markova O.V., Urazbakhtina N.A., Khairullin R.M. Complex *in vitro* biological activity of endophytic lesions isolated from pea and bean nodules*. Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN.* 2015;(4-1):25-28. (In Russian). EDN: UXPIFX.

10. Fan D., Subramanian S., Smith D.L. Plant endophytes promote growth and alleviate salt stress in Arabidopsis thaliana. *Scientific Reports.* 2020;10(1):12740. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69713-5.

11. Song P., Zhao B., Sun X., Li L., Wang Z., Ma C., et al. Effects of *Bacillus subtilis* HS5B5 on maize seed germination and seedling growth under NaCl stress conditions. *Agronomy.* 2023;13:1874. https://doi.org/10.3390/agronomy13071874.

12. Markova O.V., Garipova S.R. Adaptive potential of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties cultivated in the conditions of Southern Urals. *Problemy agrokhimii i ekologii = Agrochemistry and Ecology Problems.* 2020;(4):40-43. (In Russian). https://doi.org/10.26178/AE.2020.78.87.007. EDN: ZADIIV.

13. Garipova S.R., Shayakhmetova A.S., Lastochkina O.V., Fedorova K.A., Pusenkova L.I. Influence of bean plants inoculation by endophyte bacteria *Bacillus subtilis*on seedlings growth in model experiment and it's yield in conditions of the Southern Pre-Ural territory. *Agrokhimicheskii vestnik = Agrochemical Herald.* 2020;(6):48-53. (In Russian). https://doi.org/10.33184/dokbsu-2021.3.2 EDN: YUTLRK.

14. Iksanova M.A., Garipova S.R. Analysis of the phenology, growth and productivity of Ufimskaya and Zolotistaya bean varieties upon inoculation with endophytic bacteria *Bacillus subtilis* under the conditions of the Urals. *Doklady Bashkirskogo universiteta.* 2021;6(3):152-157. (In Russian). https://doi.org/10.33184/dokbsu-2021.3.2 EDN: LPSSBT.

15. Garipova S.R., Markova O.V., Fedorova K.A., Dedova M.A., Iksanova M.A., Kamaletdinova A.A., et al. Malondialdehyde and proline content in bean cultivars following the inoculation with endophytic bacteria. *Acta Physiologiae Plantarum.* 2022;44(7):89. https://doi.org/10.1007/s11738-022-03427-1.

16. Lastochkina O., Allagulova C., Fedorova K., Baymiev A., Koryakov I., Aliniaeifard S., et al. Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damages. *Journal of Plant Physiology.* 2021;263:153462. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153462.

17. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1968;125(1):189-198. https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1

18. Reut A.A., Denisova S.G. Resistance of decorative herbaceous plants to changing environmental conditions. *Ekobiotekh = Ecobiotech*. 2019;2(4): 456-461. (In Russian). https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-4-456-461. EDN: KDNNGA.

19. De Lima B.C., Moro A.L., Santos A.C.P., Bonifacio A., Araujo A.S.F., de Araujo F.F. *Bacillus subtilis* ameliorates water stress tolerance in maize and common bean. *Journal of Plant Interactions.*

2019;14(1):432-439. https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1645896.

20. Lubyanova A.R., Allagulova C.R., Lastochkina O.V. The effects of seed pretreatment with endophytic bacteria *Bacillus subtilis* on the water balance of spring and winter wheat seedlings under short-time water deficit. *Plants.* 2023;12(14):2684. https://doi.org/10.3390/plants12142684.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Маркова Оксана Вячеславовна,
старший преподаватель, старший научный сотрудник,
Уфимский университет науки и технологий,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
✉o-ksana@list.ru
https://orcid.org/0009-0000-5881-7636

Гарипова Светлана Равилевна,
д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник,
Уфимский университет науки и технологий,
450076, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Российская Федерация,
garipovasvetlana@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-0276-6689

Пусенкова Людмила Ивановна,
к.с.-х.н., ведущий научный сотрудник,
Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН,
450059, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 19,
Российская Федерация,
l.pusenkova@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-6341-0486

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 01.08.2023.
Одобрена после рецензирования 30.08.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Oksana V. Markova,
Senior Lecturer, Senior Researcher,
Ufa University of Science and Technology,
32, Zaki Validi St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
✉o-ksana@list.ru
https://orcid.org/0009-0000-5881-7636

Svetlana R. Garipova,
Dr. Sci. (Biology), Professor, Leading Researcher,
Ufa University of Science and Technology
32, Zaki Validi St., Ufa, 450076,
Russian Federation,
garipovasvetlana@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-0276-6689

Ludmila I. Pusenkova,
Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher,
Bashkiria Research Agricultural Institute,
Ufa Federal Research Center RAS,
19, R. Zorge St., Ufa, 450059,
Russian Federation,
l.pusenkova@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-6341-0486

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

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.

Информация о статье

The article was submitted 01.08.2023
Approved after reviewing 30.08.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 579.66:577.15
EDN: DADDCO
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-359-369

Каталитические свойства и иммобилизация ферментных препаратов, содержащих липазу галоалкалотолерантных бактерий *Pseudomonas peli* и *Bacillus aequororis*

Ю.Г. Максимова*,✉, Е.В. Пьянкова**, А.Д. Елисеева**, В.А. Щетко***, А.Ю. Максимов*,****

**Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Пермь, Российская Федерация*
***Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Российская Федерация*
****Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь*

Аннотация. *Данная статья посвящена исследованию каталитических свойств и иммобилизации ферментных препаратов, которые содержат липазу галоалкалотолерантных бактерий Pseudomonas peli и Bacillus aequororis. Из галоалкалотолерантных бактерий Pseudomonas peli 3-Т и Bacillus aequororis 5-ДБ выделена липаза и иммобилизована на карбоксиметилцеллюлозе, активированном хитозане и кормовых дрожжах. Определена pH-зависимость активности и термостабильность нативного фермента, сохранение активности при иммобилизации и высушивании иммобилизованного препарата. Установлено, что активность липазы из обоих источников повышается с увеличением щелочности реакционной среды, причем у липазы P. peli 3-Т в кислой среде активность отсутствовала, у B. aequororis 5-ДБ при pH 6–7 составляла не более 20% от максимальной. Выделенная липаза обладает достаточно высокой термостабильностью. Так, липаза P. peli 3-Т при воздействии температуры 60 и 70 °С в течение 1 ч полностью сохраняет исходную активность, а в течение 15 мин воздействие температуры 80 и 90 °С приводит к снижению активности на 73 и 83% соответственно. Из изученных носителей для иммобилизации фермента наиболее перспективны активированный хитозан и кормовые дрожжи. При высушивании иммобилизованного препарата липазы на активированном хитозане сохраняется 3 и 46% активности нативного фермента из P. peli 3-Т и B. aequororis 5-ДБ соответственно, на кормовых дрожжах – 2 и 64% соответственно.*

Ключевые слова: *иммобилизованные ферменты, липаза, галотолерантные бактерии, алкалотолерантные бактерии, термостабильность фермента*

Финансирование. *Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507 и частично в рамках темы «Поиск и селекция новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии. Создание иммунохимических диагностических систем», номер государственной регистрации НИОКТР 122010800029-1.*

Для цитирования: Максимова Ю.Г., Пьянкова Е.В., Елисеева А.Д., Щетко В.А., Максимов А.Ю. Каталитические свойства и иммобилизация ферментных препаратов, содержащих липазу галоалкалотолерантных бактерий *Pseudomonas peli* и *Bacillus aequororis* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 359–369. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-359-369. EDN: DADDCO.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Catalytic properties and immobilization of enzyme preparations containing lipase of the haloalkalotolerant bacteria *Pseudomonas peli* and *Bacillus aequororis*

Yuliya G. Maksimova*,✉, Ekaterina V. Pyankova**, Anna D. Eliseeva**, Vitaly A. Shchetko***, Alexander Yu. Maksimov*,****

© Максимова Ю.Г., Пьянкова Е.В., Елисеева А.Д., Щетко В.А., Максимов А.Ю., 2023

**Institute of Ecology and genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Perm, Russian Federation*
***Perm State University, Perm, Russian Federation*
****Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

Abstract. *In this work, we investigate the catalytic properties and immobilization of enzyme preparations containing lipase of haloalkalotolerant bacteria Pseudomonas peli and Bacillus aequororis. Lipase was isolated from the P. peli 3-T and B. aequororis 5-DB followed by its immobilization on either carboxymethylcellulose, activated chitosan or fodder yeast. The pH-dependence of native enzyme activity and thermostability, as well as the residual activity upon immobilization and drying of immobilized product, were determined. The lipase activity from both sources enhances with increasing alkalinity of the reaction medium. Specifically, P. peli 3-T lipase exhibited no activity in an acidic medium, and B. aequororis 5-DB lipase exhibited around 20% of maximum activity at a pH value of 6–7. The isolated lipase has a rather high thermostability; thus, P. peli 3-T lipase fully retains its initial activity upon heating to 60 °C and 70 °C for 1 h. Moreover, 15 min exposure to temperatures of 80 °C and 90 °C leads to an activity decrease of 73% and 83%, respectively. Activated chitosan and fodder yeast are the most promising of the studied excipients for enzyme immobilization. Drying of the immobilized lipase product on the activated chitosan showed retention of 3% and 46% of the native enzyme activity derived from P. peli 3-T and B. aequororis 5-DB, respectively. In the case of fodder yeast, these values were 2% and 64%, respectively.*

Keywords: *immobilized enzymes, lipase, halotolerant bacteria, alkalotolerant bacteria, enzyme thermostability*

Funding. *The work was supported financially by the government of the Perm Territory within the framework of scientific project no. C-26/507 and partly within the framework of the topic "Search and selection of new promising microorganisms for biotechnology purposes. Creation of immunochemical diagnostic systems", state registration number NIOKTR 122010800029-1.*

For citation: Maksimova Yu.G., Pyankova E.V., Eliseeva A.D., Shchetko V.A., Maksimov A.Yu. Catalytic properties and immobilization of enzyme preparations containing lipase of the haloalkalotolerant bacteria *Pseudomonas peli* and *Bacillus aequororis*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(3):359–369. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-359-369. EDN: DADDCO.

ВВЕДЕНИЕ

Липаза (триацилглицерол-липаза, триацил-глицерол: ацилгидролаза, КФ 3.1.1.3) катализирует разложение триглицеридов до моно-, диглицеридов, глицерина и жирных кислот в водной среде и ряд химических реакций в системах с низкой активностью воды. Липазы являются универсальными биокатализаторами, имеющими широкий спектр применений в промышленности, т.к. они катализируют такие химические реакции, как аминолиз, ацидолиз, этерификацию и переэтерификацию. Высокая активность и стабильность как в водных, так и в органических средах позволяет использовать их в производстве биодизеля, разделении энантиомеров, модификации триацилглицеринов, обогащении жирными кислотами и производстве сложных эфиров. Также липазы включают в составы моющих средств, используют в синтезе сложных эфиров сахаров и биосурфактантов, получении продуктов косметических, целлюлозно-бумажных, кожевенных, текстильных, фармацевтических, агрохимических, пищевых производств [1, 2]. Кроме того, липазы имеют перспективы использования в сельском хозяйстве. Добавление экзогенной липазы в корм животных и птицы интенсифицирует работу их органов внутренней секреции. Было показано, что при введении липазы в корма свиней и птицы концентрация эндогенного трипсина и амилазы повышается на 32,5 и 69,3% соответственно, улучшается и ускоряется пищеварительный процесс, увеличивается интенсивность роста животных [3].

Экстремофильные и экстремотолерантные бактерии, обитающие в биотопах с условиями, параметры которых значительно отличаются от нормальных «физиологических», представляют большой интерес как продуценты ферментов с уникальными свойствами. Алкалотолерантные (щелочеустойчивые) и галотолерантные (солеустойчивые) гидролитические бактерии выделяют в окружающую среду ферменты, стабильно функционирующие в условиях высокой щелочности и низкой активности воды [4, 5]. Ранее из щелочных высокоминерализованных сред содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» были выделены бактерии, устойчивые к высокой щелочности и обладающие липазной активностью, и было показано, что внеклеточная и ассоциированная с поверхностью липаза таких бактерий проявляет максимальную активность в среде с высоким pH [6, 7].

Для использования в промышленности ферментов, изолированных из клеток, необходима их стабилизация в меняющихся условиях окружающей среды, долговременное сохранение активности, возможность многократного применения. В этих целях дополнительным этапом подготовки ферментного препарата является иммобилизация белков – ограничение подвижности молекул с возможностью беспрепятственной диффузии субстратов и продуктов. Иммобилизованные ферменты более стабильны, чем ферменты в свободной форме, и могут использоваться для осуществления непрерывных биокаталитических реакций [8]. Несмотря на универсальность липаз и других ферментов для промышленного применения, ряд ограничений не позволяет использовать их в промышленных масштабах. Основными недостатками являются физическая (агрегация, осаждение и потеря третичной структуры) или химическая (дезаминирование, фрагментация и

окисление) нестабильность при хранении или в рабочих стадиях реакции, особенно в органическом растворителе, а также высокая стоимость этих биокатализаторов, связанная со сложностью регенерации и долговременного использования [2].

Для иммобилизации ферментов, в частности липаз, используются различные методы: адсорбция на нерастворимом носителе, включение в структуру гелей или инкапсуляция, ковалентная сшивка с носителем, поперечная сшивка белковых агрегатов бифункциональными реагентами [9–11]. При использовании безводных сред, например, в реакции этерификации, происходит агрегация и осаждение фермента из раствора. В этом случае иммобилизация биокатализатора может снизить диффузионные затруднения, препятствуя агрегации. Для иммобилизации липаз использовали все перечисленные выше методы, добиваясь многократного (до 20 циклов) функционирования биокатализатора в процессе получения биодизельного топлива [12]. Было установлено, что удельная активность липазы, иммобилизованной на хитозане, увеличивалась по сравнению с несвязанным ферментом [13]. Липаза на хитозане, активированном полиальдегидкрахмалом, была стабильна при температуре до 70 °С в гидрофобных и гидрофильных органических растворителях и использовалась для кинетического разделения вторичных спиртов [14]. Липаза, ковалентно иммобилизованная на активированной глутаровым альдегидом рисовой шелухе, жоме сахарного тростника и волокне зеленого кокоса, сохранила 94, 90 и 89% исходной активности соответственно [15]. Иммобилизованные на бентоните липазы обладали лучшей температурной и pH-стабильностью по сравнению со свободными [16]. В настоящее время в качестве носителя ферментов, в частности липазы, достаточно широко используют наноматериалы [17]. Гетерогенный биокатализатор в виде липазы, адсорбированной на макропористом углеродном аэрогеле в виде хаотично переплетенных многостенных углеродных нанотрубок, был стабилен в реакциях этерификации, протекающих в органических растворителях, в течение нескольких десятков часов в периодических реакционных циклах [18]. Иммобилизованный препарат в виде липазы, адсорбированной на многостенных углеродных нанотрубках, функционализированных эпоксигруппами, использовали для кинетического разделения рац-ибупрофена путем этерификации ибупрофена в изооктане в качестве растворителя [19]. Липаза на композиционном материале, в состав которого входили галлуазитовые нанотрубки, катализировала гидролиз сложных эфиров фталевой кислоты с эффективностью до 95% [20]. Липаза на активированных глутаровым альдегидом нановолокнах оксида графена/хитозана/ацетата целлюлозы обладала более высокой активностью, чем свободная, в кислой среде и была использована в синтезе бензилацетата из бензилового спирта и винилацетата [21]. Иммобилизованная на магнитных многослойных углеродных нанотрубках липаза по сравнению с растворимой формой обладала большей термо- и pH-стабильностью, возможностью повторного использования, легкостью отделения от среды [22]. Хорошую термостабильность и возможность повторного использования в 8 циклах с 80%-м сохранением активности наблюдали у липазы, иммобилизованной на магнитном оксиде графена [23]. Однако, несмотря на то, что иммобилизация липаз для различных химических процессов осуществляется достаточно масштабно, разработка препаратов иммобилизованной липазы в качестве кормовой добавки имеет свои особенности и требует дополнительных исследований. Во-первых, носитель и способ иммобилизации не должны быть причиной токсичности препарата, во-вторых, важным требованием к иммобилизованному препарату является его стабильность при хранении, и, в-третьих, должна быть обеспечена возможность функционирования препарата в пищеварительной системе сельскохозяйственных животных. Для решения данной задачи благодаря таким качествам, как нетоксичность, биосовместимость, способность к биологическому разложению и наличие многочисленных реакционных участков, перспективны биополимеры природного происхождения, такие как альгинат, хитозан, целлюлоза, агароза, гуаровая камедь, агар, каррагинан, желатин, декстран, ксантан, пектины, используемые как носители для иммобилизации ферментов [24–26]. В данной работе сравнивались различные методы иммобилизации липазы с использованием в качестве носителей кормовых дрожжей, карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и хитозана.

Цель работы – изучить каталитические свойства (активность, термо- и pH-стабильность) ферментного препарата, содержащего липазу *Pseudomonas peli* 3-Т и *Bacillus aequororis* 5-ДБ в свободной форме, и влияние процесса иммобилизации, высушивания и хранения на активность иммобилизованной липазы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Pseudomonas peli 3-Т (ВКМ В-3617D), выделенный с поверхности грунта старой карты содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» [6], культивировали на минеральной среде Пфеннига составом (г/л): KH_2PO_4 – 0,3; $MgCl_2$ – 0,3; $CaCl_2$ – 0,03; дрожжевой экстракт – 0,5 (pH 8) с 1%-м глицерином в качестве источника углерода, 0,03%-й мочевиной в качестве источника азота и микроэлементами по Липперту – в колбах Эрленмейера при температуре 30 °С на шейкере со скоростью вращения платформы 100 об/мин в течение 5 суток.

Bacillus aequororis 5-ДБ (ВКМ В-3610D), выделенный с поверхности грунта старой карты содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» [6], культивировали на среде составом (г/л): пептон – 10, глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 5, K_2HPO_4 – 1, Na_2CO_3 – 10, (pH 11) в условиях, описанных выше.

Биомассу *P. peli* 3-Т и pps 5-ДБ центрифугировали 10 мин при 5000 *g*, отмывали от среды калий-фосфатным буфером (pH=8) однократно, центрифугировали повторно и разрушали ультразвуковым дезинтегратором УЗГ8-0,4/22 (АО «ВНИИ ТВЧ», Россия) при частоте 22 кГц с охлаждением до 0–4 °С, режим обработки – 7 раз по 20 сек и 10 раз по 15 сек соответственно. Суспензию, содержащую разрушенные клетки, центрифугировали 20 мин при 5000 *g* с охлаждением (4 °С). Лизат клеток *P. peli* 3-Т использовали без дальнейшей очистки, высаливание липазы *B. aequororis* 5-ДБ проводили сульфатом аммония до 35% от насыщающей концентрации и центрифугировали 20 мин при 5000 *g* с охлаждением. Осадок

ресуспендировали в фосфатном буфере, концентрацию белка устанавливали по методике Бредфорд.

Активность липазы определяли следующим образом: к 4 см^3 раствора выделенного из бактериальных клеток белка в фосфатном буфере с pH=8 добавляли 0,05 см^3 р-нитрофениллаурата в конечной концентрации 10 мМ и измеряли оптическую плотность окрашенного продукта р-нитрофенола при λ=405 нм на спектрофотометре SmartSpec™ Plus (Bio-Rad, США) при температуре 25 °С в течение 1 ч.

Активность липазы (Е) рассчитывали по формуле (1):

$$E = ОП \times 10^6 / 18{,}3 \times 10^3 \times l \times t, \text{ мкмоль/мин/л}, \quad (1)$$

где ОП – оптическая плотность; 10^6 – коэффициент пересчета моль в мкмоль; $18{,}3 \times 10^3$ – коэффициент молярной экстинкции р-нитрофенола, л/см/моль; l – толщина кюветы, см; t – время инкубации пробы, мин [7].

Активность липазы в расчете на г белка вычисляли по формуле (2):

$$E' = 1000 \times E/C, \text{ мкмоль/мин/г}, \quad (2)$$

где Е – активность липазы, мкмоль/мин/л; С – концентрация белка в реакционной смеси, мкг/мл.

Удельную активность липазы (Ед) выражали в мкмоль/мин и относили к л раствора фермента (Ед/л) или г фермента (Ед/г), вступившего в реакцию. При сравнении удельной активности фермента, проявляемой в разных условиях, использовали относительные единицы (%).

Определение оптимума pH и термостабильности. Штаммы, использованные в работе, были выделены из щелочной среды обитания. В связи с этим активность липазы изучали в среде от слабокислой до сильнощелочной. Чтобы определить оптимум pH-проявления активности липазы *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ, белковый раствор вносили в фосфатный буфер с pH от 6 до 11 и проводили реакцию с р-нитрофениллауратом в качестве субстрата. За 100% принимали активность фермента при pH=10. Чтобы оценить термостабильность фермента, раствор белка выдерживали при температурах 60, 70, 80, 90 °С в течение 15, 30, 45 и 60 мин в фосфатном буфере с pH=8, охлаждали до температуры 25 °С и проводили реакцию с р-нитрофениллауратом. За 100% принимали активность липазы, инкубированной при температуре 25 °С в фосфатном буфере с pH=8.

Иммобилизованный ферментный препарат получали тремя способами. Первый способ: белок адсорбировали на кормовых дрожжах (ООО «МИРАГРО», Россия) в течение 1 ч, отделяли дрожжи с иммобилизованным белком фильтрованием через бумажный фильтр и определяли в фильтрате концентрацию белка по Бредфорд. Величину адсорбции белка (А) на носителе устанавливали по формуле (3):

$$A = V (C_{исх} - C_{ост}) \times 1000/M, \text{ мкг/г}, \quad (3)$$

где V – объем раствора белка; $C_{исх}$ – концентрация белка в растворе до адсорбции, мкг/мл; $C_{ост}$ – концентрация белка в растворе после адсорбции, мкг/мл; М – масса носителя, мг.

Второй способ: белок иммобилизовали в гидрогеле КМЦ, сшитой 1%-й лимонной кислотой. Для этого готовили 2%-й раствор КМЦ в воде, переме шивая в течение 1 ч при температуре 70 °С, добавляли 1%-й раствор лимонной кислоты до конечной концентрации 0,05%, перемешивали 30 мин [27]. Полученный раствор разливали в чашки Петри слоем 5 мм и высушивали при температуре 70 °С до образования пленки, измельчали ее в фарфоровой ступке и смешивали с раствором белка в соотношении 2–4 см^3 ферментного препарата на 0,5 г порошкообразной КМЦ, после 1 ч адсорбции отмывали от несвязанного белка фосфатным буфером и определяли липазную активность в реакции с р-нитрофенолом.

Третий способ: белок ковалентно связывали с активированным хитозаном. Готовили 2%-й раствор хитозана в 2%-й уксусной кислоте и накапывали в 1 М раствор КОН, оставляли на 4 ч для отвердения, отмывали фосфатным буфером (pH=7,2±0,2) до нейтральной реакции промывных вод. Для активации к гранулам добавляли 0,1%-й раствор глутарового альдегида на 1 ч. Затем добавляли раствор белка к активированным гранулам хитозана и выдерживали 24 ч в статических условиях при температуре 10 °С, после чего отделяли несвязавшийся белок фильтрованием через бумажный фильтр и определяли количество белка в фильтрате по методике Бредфорд. Массу ковалентно-сшитого белка устанавливали по формуле (3).

Сохранение липазной активности иммобилизованных препаратов при хранении изучали следующим образом. Иммобилизованный ферментный препарат высушивали при температуре 30 °С до постоянного веса и хранили при температуре 25 °С в течение двух недель. После этого проводили реакцию с р-нитрофениллауратом, как описано выше.

Статистическая обработка результатов. Результаты получали не менее чем в трех независимых опытах. Статистический анализ результатов проводили с помощью стандартного пакета лицензионной программы MS Excel 2007, определяли среднее арифметическое, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего (M±m). Отсутствие значимых различий между результатами независимых опытов подтверждали при использовании t-критерия Стьюдента, p>0,05.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ферментный препарат, содержащий липазу *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ, был получен при лизисе бактериальных клеток ультразвуком и преципитации белка в присутствии сульфата аммония. Для *P. peli* 3-Т высаливание не давало преимуществ, в дальнейшем использовали клеточный лизат. При этом активность повышалась с 3,68 Ед/л у клеточной суспензии до 27,82 Ед/л у лизированных клеток. У *B. aequororis* 5-ДБ для последующих экспериментов использовали фракцию, полученную высаливанием 35%-м сульфатом аммония, при этом активность повышалась с 4,3 Ед/л у клеточной суспензии до 11,4 и 94,8 Ед/л у клеточного лизата и фракции соответственно.

Изучили каталитические свойства полученного ферментного препарата: зависимость липазной активности от pH реакционной среды и термостабильность биокатализатора. Показано, что наибольшая активность фермента проявлялась в щелочной среде (табл. 1, рис. 1). У липазы *P. peli* 3-Т в кислой среде активность отсутствовала, у *B. aequororis* 5-ДБ при pH=6–7 составляла

Таблица 1. Активность липазы, выделенной из *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ, при различных pH, Ед/г

Table 1. Activity of lipase isolated from *P. peli* 3-T and *B. aequororis* 5-DB at different pH, U/g

Источник выделения	pH				
	6	7	8	9	10
P. peli 3-Т	0	15,40	17,33	54,88	144,41
B. aequororis 5-ДБ	0,99	1,59	8,89	8,77	10,60

Примечание. Представлены данные единичного опыта. Тенденция повторяется в трех независимых экспериментах (p>0,05).

не более 20% от максимальной. Диапазон pH, при котором проявляет активность липаза *B. aequororis* 5-ДБ, более широк, и активность фермента при pH=6 близка к таковой при pH=7.

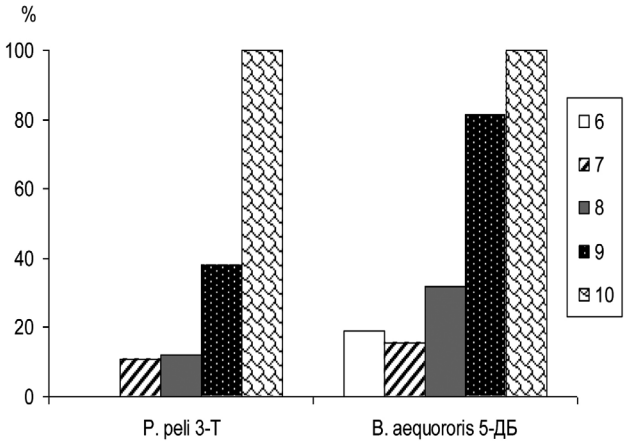


Рис. 1. Зависимость липазной активности от pH

Fig. 1. Relationship between lipase activity and pH

Определена термостабильность ферментного препарата. Установлено, что липаза, выделенная из клеток галоалкалотолерантных бактерий, обладает достаточно высокой термостабильностью, несмотря на то, что данные микроорганизмы не являются термофилами. Это может быть связано с общей адаптивной способностью организмов экстремальных сред обитания. Так, липаза *P. peli* 3-Т при воздействии 60 и 70 °С в течение 1 ч полностью сохраняет исходную активность, и только воздействие 80 и 90 °С в течение 15 мин приводит к снижению активности на 73 и 83% соответственно (рис. 2, табл. 2). Липаза *B. aequororis* 5-ДБ при температуре 90 °С и после 60 мин экспозиции при температуре 80 °С теряет свою активность, однако при температуре 60 и 70 °С не ингибирует ее (рис. 3, см. табл. 2).

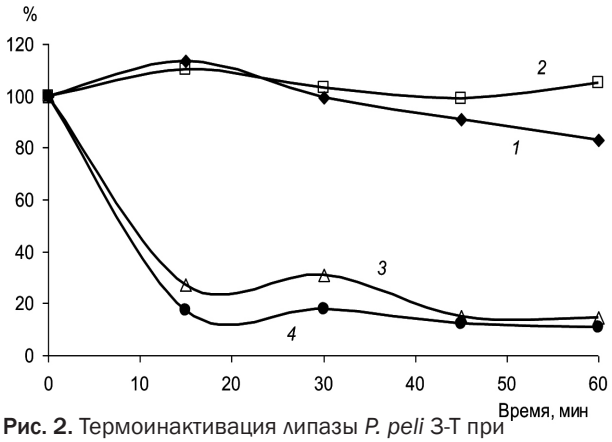


Рис. 2. Термоинактивация липазы *P. peli* 3-Т при воздействии 60 (1), 70 (2), 80 (3) и 90 °С (4)

Fig. 2. Thermal inactivation of *P. peli* 3-T lipase upon exposure to 60 (1), 70 (2), 80 (3) and 90 °C (4)

Таблица 2. Активность липазы *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ при воздействии повышенной температуры, Ед/г

Table 2. Activity of *P. peli* 3-T and *B. aequororis* 5-DB lipases exposed to elevated temperature, U/g

Время, мин	Температура, °С			
	60	70	80	90
P. peli 3-Т				
15	65,63±1,73	63,78±2,96	58,58±5,55	36,77±2,38
30	57,59±3,88	59,83±2,11	66,30±2,48	37,72±3,83
45	52,61±4,65	57,33±1,48	31,71±0,23	26,02±1,79
60	48,18±2,44	60,76±2,92	30,56±0,45	23,41±1,15
B. aequororis 5-ДБ				
15	17,46±2,06	25,37±0,00	27,44±0,00	0
30	19,52±0,65	33,94±0,00	19,40±0,00	0
45	16,37±6,39	35,56±0,00	23,30±0,00	0
60	21,47±0,22	21,19±0,00	0	0

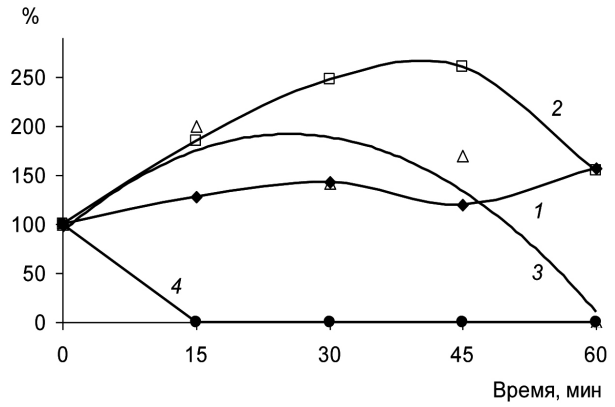


Рис. 3. Термоинактивация липазы *B. aequororis* 5-ДБ при воздействии 60 (1), 70 (2), 80 (3) и 90 °С (4)

Fig. 3. Thermal inactivation of *B. aequororis* 5-DB lipase upon exposure to 60 (1), 70 (2), 80 (3) and 90 °C (4)

Определена величина адсорбции белка на КМЦ и кормовых дрожжах, а также величина связывания на активированном хитозане за счет ковалентной сшивки с бифункциональным реагентом – глутаровым альдегидом. Установлено, что носителем, связывающим наибольшее количество фермента, является активированный хитозан (табл. 3). На КМЦ связывается значительно меньшее количество белка, выделенного из *P. peli* 3-Т, чем на активированном хитозане. Адсорбция белка из *B. aequororis* 5-ДБ на КМЦ отсутствовала. На кормовых дрожжах определить массу адсорбированного белка не представлялось возможным, т.к. белок, входящий в состав носителя, мешал измерению.

Определена активность липазы сразу после иммобилизации и у иммобилизованных биокатализаторов после высушивания и хранения в течение двух недель. Данные по сохранению активности липазы после иммобилизации, высушивания и хранения ферментных препаратов обобщены в табл. 4. Липазная активность после иммобилизации белка, выделенного из *P. peli* 3-Т, снижалась и составляла 2–3% от исходной. Отмечено, что активность препарата иммобилизованной липазы *P. peli* 3-Т после высушивания зависела от носителя, на котором осуществляли иммобилизацию: так, липаза на КМЦ значительно теряла свою активность, но высушивание не влияло на активность липазы на хитозане и дрожжах. Активность липазы из *B. aequororis* 5-ДБ после связывания с хитозаном сохранялась в пределах 10–11% от таковой нативного фермента, а после высушивания биокатализатора значительно возрастала. Возможно, при регидратации гранул фермент выходил в раствор, что приводило к снижению диффузионных затруднений при массообмене субстрата и продукта и, в свою очередь, к увеличению скорости ферментативной реакции.

Иммобилизованный на носителе и высушенный фермент является наиболее удобной формой для дальнейшего хранения и использования. Однако сам процесс иммобилизации может затрагивать активный центр фермента, приводя к снижению и даже ингибированию его активности, что требует скрининга носителей и методов иммобилизации для получения активного и стабильного биокатализатора. В нашем исследовании показано, что иммобилизация белкового препарата, содержащего липазу, на активированном хитозане более предпочтительна, чем на КМЦ. Связи, возникающие при адсорбции белка на носителе, гораздо более слабые, чем при ковалентной сшивке с активированным хитозаном, поэтому последний способ более эффективен, чем адсорбция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липаза, выделенная из клеток галоалкалотолерантных бактерий *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ, проявляла максимальную активность в сильнощелочной среде, при этом фермент из грамположительных бацилл был активен в более широком диапазоне pH, включая слабокислую среду (pH=6).

Выделенная из *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ липаза обладала высокой термостабильностью. Липаза *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ при воздействии 60 и 70 °С в течение 1 ч сохраняла 100% исходной активности; воздействие 80 и 90 °С в течение 15 мин приводило к снижению активности липазы *P. peli* 3-Т на 73 и 83% соответственно, воздействие 90 °С в течение 15 мин и воздействие 80 °С в течение 60 мин ингибировало активность липазы *B. aequororis* 5-ДБ.

Иммобилизация липазы методом адсорбции на кормовых дрожжах, геле КМЦ и ковалентной сшивкой с активированным хитозаном приводила к снижению исходной активности нативного фермента, при иммобилизации липазы *B. aequororis* 5-ДБ на дрожжах и активированном хитозане сохранялось 10–11% исходной активности. Величина адсорбции белка на активированном хитозане значительно пре-

Таблица3. Связывание на носителях ферментного препарата, содержащего липазу *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ

Table 3. Binding on carriers of an enzyme preparation containing *P. peli* 3-T and *B. aequororis* 5-DB lipase

Носители	Источник выделения			
	P. peli 3-Т		*B. aequororis* 5-ДБ	
	Масса адс. белка, мкг	А, мкг/г	Масса адс. белка, мкг	А, мкг/г
Карбоксиметилцеллюлоза	10,43±3,34	24,49±8,47	0	0
Активированный хитозан	66,35±7,93	532,09±63,62	164,19±14,91	1313,52±119,28
Дрожжи	н/о*	н/о	н/о	н/о

Примечание. *– не определено. Исходная концентрация белка, выделенного из *P. peli* 3-Т, – 67,56±16,14 мкг/мл, из *B. aequororis* 5-ДБ – 84,32±9,04 мкг/мл.

Таблица 4. Липазная активность иммобилизованных препаратов

Table 4. Lipase activity of immobilized preparations

Способ иммобилизации, носитель	Удельная липазная активность					
	После иммобилизации			После высушивания иммобилизованного препарата		
	Ед/л	Ед/г	Сохранение, %	Ед/л	Ед/г	Сохранение, %
Источник выделения – *P. peli* 3-Т						
Иммобилизация в структуре геля карбоксиметилцеллюлозы	0,347±0,069	92,37±34,57	2,7	0,038±0,010	10,45±3,11	0,3
Ковалентная сшивка, гранулы хитозана, активированного 0,1%-м глутаровым альдегидом	0,410±0,000	31,38±0,00	3,2	0,420±0,148	21,41±6,63	3,3
Адсорбция, кормовые дрожжи	0,350±0,088	н/о	2,7	0,252±0,044	н/о	2,0
Источник выделения – *B. aequororis* 5-ДБ						
Иммобилизация в структуре геля карбоксиметилцеллюлозы	–	–	0	–	–	0
Ковалентная сшивка, гранулы хитозана, активированного 0,1%-м глутаровым альдегидом	0,448±0,000	5,79±0,00	11,3	1,832±0,000	39,16±4,01	46,0
Адсорбция, кормовые дрожжи	0,413±0,000	н/о	10,4	2,556±0,000	н/о	64,2

Примечание. Исходная активность белкового препарата липазы *P. peli* 3-Т – 12,85±4,34 Ед/л (178,04±24,80 Ед/г), *B. aequororis* 5-ДБ – 3,98 Ед/л (36,43 Ед/г).

вышала таковую на КМЦ и составляла 532,09±63,62 и 1313,52±119,28 мкг/г носителя для липазы из *P. peli* 3-Т и *B. aequororis* 5-ДБ соответственно.

Высушивание белкового препарата, содержащего липазу *B. aequororis* 5-ДБ, иммобилизованного на кормовых дрожжах и активированном хитозане, приводило к повышению активности по сравнению с влажным иммобилизованным препаратом после хранения в течение двух недель в 4,5–6 раз.

В качестве биокатализатора может быть предложена липаза из *B. aequororis* 5-ДБ, иммобилизованная на активированном 0,1%-м глутаровым альдегидом хитозане с последующим высушиванием препарата и неиммобилизованная липаза из *P. peli* 3-Т.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Безбородов А.М., Загустина Н.А. Липазы в реакциях катализа в органическом синтезе (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. N 4. С. 347–373. https://doi.org/10.7868/S0555109914040187. EDN: QJJFEO.

2. Costa-Silva T.A., Carvalho A.K.F., Souza C.R.F., De Castro H.F., Bachmann L., Said S., et al. Enhancement lipase activity via immobilization onto chitosan beads used as seed particles during fluidized bed drying: application in butyl butyrate production // Applied Catalysis A: General. 2021. Vol. 622. P. 118217. https://doi.org/10.1016/j.apcata.2021.118217.

3. Щербинин С. Экзогенная липаза снижает стоимость корма // Корма и кормопроизводство. 2018. N 4. С. 55–57.

4. Fujinami S., Fujisawa M. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes – past, present and future // Environmental Technology. 2010. Vol. 31, no. 8-9. P. 845–856. https://doi.org/10.1080/09593331003762807.

5. Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms // Environmental Technology. 2010. Vol. 31, no. 8-9. P. 825–834. https://doi.org/10.1080/09593330903370026.

6. Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Выделение и идентификация алкалотолерантных бактерий с гидролитической активностью из содового шламохранилища // Микробиология. 2021. Т. 90. N 2. С. 155–165. https://doi.org/10.31857/S0026365621020130. EDN: KLWPKV.

7. Максимова Ю.Г., Шилова А.В., Егорова В.В., Щетко В.А., Максимов А.Ю. Физиолого-биохимическая характеристика и биотехнологический потенциал гидролитических галоалкалотолерантных бактерий содового шламохранилища // Известия РАН. Серия биологическая. 2023. N 2. С. 149–159. https://doi.org/10.31857/S1026347022700068. EDN: HANYNK.

8. Xie J., Zhang Y., Simpson B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications // Current Opinion in Food Science. 2022. Vol. 43. P. 27–35. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.09.004.

9. Fernandez-Lafuente R. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation

// Enzyme and Microbial Technology. 2009. Vol. 45, no. 6-7. P. 405–418.
https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.009.

10. Remonatto D., Miotti R.H., Monti R., Bassan J.C., de Paula A.V. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: a review // Process Biochemistry. 2022. Vol. 114. P. 1–20.
https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004.

11. Sampaio C.S., Angelotti J.A.F., Fernandez-Lafuente R., Hirata D.B. Lipase immobilization via crosslinked enzyme aggregates: problems and prospects – a review // International Journal of Biological Macromolecules. 2022. Vol. 215. P. 434–449.
https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.139.

12. Quayson E., Amoah J., Hama S., Kondo A., Ogino C. Immobilized lipases for biodiesel production: current and future greening opportunities // Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2020. Vol. 134. P. 110355.
https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110355.

13. Manan F.M.A., Attan N., Zakaria Z., Mahat N.A., Wahab R.A. Insight into the *Rhizomucor miehei* lipase supported on chitosan-chitin nanowhiskers assisted esterification of eugenol to eugenyl benzoate // Journal of Biotechnology. 2018. Vol. 280. P. 19–30.
https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.015.

14. Alves dos Santos L., Alnoch R.C., Soares G.A., Mitchell D.A., Krieger N. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on chitosan crosslinked with polyaldehyde starch for kinetic resolution of sec-alcohols // Process Biochemistry. 2022. Vol. 122. P. 238–247.
https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.10.014.

15. Costa-Silva T.A., Carvalho A.K.F., Souza C.R.F., Freitas L., De Castro H.F., Oliveira W.P. Highly effective *Candida rugosa* lipase immobilization on renewable carriers: Integrated drying and immobilization process to improve enzyme performance // Chemical Engineering Research and Design. 2022. Vol. 183. P. 41–55.
https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.04.026.

16. Pourkhanali K., Khayati G., Mizani F., Raouf F. Characterization of free and immobilized lipase from *Penicillium* sp. onto three modified bentonites: a comparative study // Journal of Biotechnology. 2022. Vol. 344. P. 57–69.
https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.12.013.

17. Tan Z., Bilal M., Li X., Ju F., Teng Y., Iqbal H.M.N. Nanomaterial-immobilized lipases for sustainable recovery of biodiesel – a review // Fuel. 2022. Vol. 316. P. 123429.
https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123429.

18. Kovalenko G., Perminova L., Beklemishev A. Heterogeneous biocatalytical esterification by recombinant *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on macroporous carbon aerogel // Catalysis Today. 2021. Vol. 379. P. 36–41.
https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.11.018.

19. Moguei M.R.S., Habibi Z., Shahedi M., Yousefi M., Alimoradi A., Mobini S., et al. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase through isocyanide-based multi component reaction on multi-walled carbon nanotube: application for kinetic resolution of rac-ibuprofen // Biotechnology Reports. 2022. Vol. 35. P. e00759.
https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00759.

20. Sun Y., Guo M., Hu S., Fang X., Jin Z., Wu R. Nanosurface-immobilized lipase and its degradation of phthalate wastewater // Molecular Catalysis. 2022. Vol. 529. P. 112522.
https://doi.org/10.1016/j.mcat.2022.112522.

21. Badoei-dalfard A., Tahami A., Karami Z. Lipase immobilization on glutaraldehyde activated graphene oxide/chitosan/cellulose acetate electrospun nanofibrous membranes and its application on the synthesis of benzyl acetate // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2022. Vol. 209. P. 112151.
https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112151.

22. Ghide M.K., Li K., Wang J., Abdulmalek S.A., Yan Y. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase on magnetic multiwalled carbon nanotubes towards the synthesis of structured lipids rich in *sn*-2 palmitic acid and *sn*-1,3 oleic acid (OPO) for infant formula use // Food Chemistry. 2022. Vol. 390. P. 133171.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133171.

23. Yu D., Li Z., Zhou X., Wang W., Wang L., Liu T., et al. Study on the modification of magnetic graphene oxide and the effect of immobilized lipase // International Journal of Biological Macromolecules. 2022. Vol. 216. P. 498–509.
https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.203.

24. Bilal M., Iqbal H.M.N. Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization // International Journal of Biological Macromolecules. 2019. Vol. 130. P. 462–482.
https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152.

25. Sharma A., Thatai K.S., Kuthiala T., Singh G., Arya S.K. Employment of polysaccharides in enzyme immobilization // Reactive and Functional Polymers. 2021. Vol. 167. P. 105005.
https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105005.

26. Vassiliadi E., Aridas A., Schmitt V., Xenakis A., Zoumpanioti M. (Hydroxypropyl)methyl cellulose-chitosan film as a matrix for lipase immobilization: operational and morphological study // Molecular Catalysis. 2022. Vol. 522. P. 112252.
https://doi.org/10.1016/j.mcat.2022.112252.

27. Холназаров Б.А., Тураев Х.Х., Назаров Ю.Э. Синтез гидрогелей на основе биоматериалов крахмала и натрий-карбоксиметилцеллюлозы // Universum: химия и биология. 2020. N 10. С. 57–60.

REFERENCES

1. Bezborodov A.M., Zagustina N.A. Lipases in catalytic reactions of organic chemistry. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology.* 2014;50(4):347-373. (In Russian).
https://doi.org/10.7868/S0555109914040187. EDN: QJJFEO.

2. Costa-Silva T.A., Carvalho A.K.F., Souza C.R.F., De Castro H.F., Bachmann L., Said S., et al. Enhancement lipase activity via immobilization onto chitosan beads used as seed particles during fluidized bed drying: application in butyl butyrate production. *Applied Catalysis A: General.* 2021;622:118217.
https://doi.org/10.1016/j.apcata.2021.118217.

3. Shcherbinin S. Exogenous lipase reduces feed cost. *Korma i kormoproizvodstvo.* 2018;(4):55-57. (In Russian).

4. Fujinami S., Fujisawa M. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes – past, present and future. *Environmental Technology.* 2010;31(8-9):845-856.
https://doi.org/10.1080/09593331003762807.

5. Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology.* 2010;31(8-9):825-834. https://doi.org/10.1080/09593330903370026.

6. Shilova A.V., Maksimov A.Y., Maksimova Y.G. Isolation and identification of alkalitolerant bacteria with hydrolytic activity from a soda sludge storage. *Mikrobiologiya = Microbiology.* 2021;90(2):155-165. (In Russian). https://doi.org/10.31857/S0026365621020130. EDN: KLWPKV.

7. Maksimova Yu.G., Shilova A.V., Egorova V.V., Shchetko V.A., Maksimov A.Yu. Physiological and biochemical characteristics, and biotechnological potential of hydrolitic haloalkalitolerant bacteria of soda sludge storage. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya = Proceedings of the Russian Academy of Sciences. Biological Series.* 2023;(2):149-159. (In Russian). https://doi.org/10.31857/S1026347022700068. EDN: HANYNK.

8. Xie J., Zhang Y., Simpson B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications. *Current Opinion in Food Science.* 2022;43:27-35. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.09.004.

9. Fernandez-Lafuente R. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology.* 2009;45(6-7):405-418. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.009.

10. Remonatto D., Miotti R.H., Monti R., Bassan J.C., de Paula A.V. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: a review. *Process Biochemistry.* 2022;114:1-20. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004.

11. Sampaio C.S., Angelotti J.A.F., Fernandez-Lafuente R., Hirata D.B. Lipase immobilization via crosslinked enzyme aggregates: problems and prospects – a review. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2022;215:434-449. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.139.

12. Quayson E., Amoah J., Hama S., Kondo A., Ogino C. Immobilized lipases for biodiesel production: current and future greening opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2020;134:110355. https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110355.

13. Manan F.M.A., Attan N., Zakaria Z., Mahat N.A., Wahab R.A. Insight into the *Rhizomucor miehei* lipase supported on chitosan-chitin nanowhiskers assisted esterification of eugenol to eugenyl benzoate. *Journal of Biotechnology.* 2018;280:19-30. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.015.

14. Alves dos Santos L., Alnoch R.C., Soares G.A., Mitchell D.A., Krieger N. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on chitosan crosslinked with polyaldehyde starch for kinetic resolution of sec-alcohols. *Process Biochemistry.* 2022;122:238-247. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.10.014.

15. Costa-Silva T.A., Carvalho A.K.F., Souza C.R.F., Freitas L., De Castro H.F., Oliveira W.P. Highly effective *Candida rugosa* lipase immobilization on renewable carriers: Integrated drying and immobilization process to improve enzyme performance. *Chemical Engineering Research and Design.* 2022;183:41-55. https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.04.026.

16. Pourkhanali K., Khayati G., Mizani F., Raouf F. Characterization of free and immobilized lipase from *Penicillium* sp. onto three modified bentonites: a comparative study. *Journal of Biotechnology.* 2022;344:57-69. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.12.013.

17. Tan Z., Bilal M., Li X., Ju F., Teng Y., Iqbal H.M.N. Nanomaterial-immobilized lipases for sustainable recovery of biodiesel – a review. *Fuel.* 2022;316:123429. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123429.

18. Kovalenko G., Perminova L., Beklemishev A. Heterogeneous biocatalytical esterification by recombinant *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on macroporous carbon aerogel. *Catalysis Today.* 2021;379:36-41. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.11.018.

19. Moguei M.R.S., Habibi Z., Shahedi M., Yousefi M., Alimoradi A., Mobini S., et al. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase through isocyanide-based multi component reaction on multi-walled carbon nanotube: application for kinetic resolution of rac-ibuprofen. *Biotechnology Reports.* 2022;35:e00759. https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00759.

20. Sun Y., Guo M., Hu S., Fang X., Jin Z., Wu R. Nanosurface-immobilized lipase and its degradation of phthalate wastewater. *Molecular Catalysis.* 2022;529:112522. https://doi.org/10.1016/j.mcat.2022.112522.

21. Badoei-dalfard A., Tahami A., Karami Z. Lipase immobilization on glutaraldehyde activated graphene oxide/chitosan/cellulose acetate electrospun nanofibrous membranes and its application on the synthesis of benzyl acetate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2022;209:112151. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112151.

22. Ghide M.K., Li K., Wang J., Abdulmalek S.A., Yan Y. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase on magnetic multiwalled carbon nanotubes towards the synthesis of structured lipids rich in *sn*-2 palmitic acid and *sn*-1,3 oleic acid (OPO) for infant formula use. *Food Chemistry.* 2022;390:133171. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133171.

23. Yu D., Li Z., Zhou X., Wang W., Wang L., Liu T., et al. Study on the modification of magnetic graphene oxide and the effect of immobilized lipase. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2022;216:498-509. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.203.

24. Bilal M., Iqbal H.M.N. Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2019;130:462-482. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152.

25. Sharma A., Thatai K.S., Kuthiala T., Singh G., Arya S.K. Employment of polysaccharides in enzyme immobilization. *Reactive and Functional Polymers.* 2021;167:105005. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105005 .

26. Vassiliadi E., Aridas A., Schmitt V., Xenakis A., Zoumpanioti M. (Hydroxypropyl)methyl cellulose-chitosan film as a matrix for lipase immobilization: operational and morphological study. *Molecular Catalysis.* 2022;522:112252. https://doi.org/10.1016/j.mcat.2022.112252 .

27. Kholnazarov B.A., Turaev H.H., Nazarov Yu.E. Synthesis of hydrogels based on starch biomaterials and sodium-carboxymethylcellulose. *Universum: khimiya i biologiya.* 2020;(10):57-60. (In Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Максимова Юлия Геннадьевна,
д.б.н., заведующая лабораторией,
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН,
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13,
Российская Федерация;
профессор,
Пермский государственный национальный исследовательский университет,
614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
Российская Федерация,
✉yul_max@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-1870-1369

Пьянкова Екатерина Валерьевна,
студент,
Пермский государственный национальный исследовательский университет,
614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
Российская Федерация;
инженер,
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН,
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13,
Российская Федерация,
19katya991@rambler.ru
https://orcid.org/0000-0002-0670-3829

Елисеева Анна Дмитриевна,
студент,
Пермский государственный национальный исследовательский университет,
614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
Российская Федерация,
liamrik@list.ru
https://orcid.org/0000-0002-6990-1902

Щетко Виталий Анатольевич,
к.б.н., начальник отдела «Научно-производственный центр биотехнологий»,
Институт микробиологии НАН Беларуси,
220141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 2,
Республика Беларусь,
vental@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-6322-5755

Максимов Александр Юрьевич,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН,
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13,
Российская Федерация;
доцент,
Пермский государственный национальный исследовательский университет,
614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15,
Российская Федерация,
almaks1@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-2591-3351

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yuliya G. Maksimova,
Dr. Sci. (Biology), Head of the Laboratory,
Institute of Ecology and genetics of Microorganisms,
Perm Federal Research Center,
13, Golev St., Perm, 614081,
Russian Federation;
Professor,
Perm State University,
15, Bukirev St., Perm, 614068,
Russian Federation,
✉yul_max@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-1870-1369

Ekaterina V. Pyankova,
Student,
Perm State University,
15, Bukirev St., Perm, 614068,
Russian Federation;
Engineer,
Institute of Ecology and genetics of Microorganisms,
Perm Federal Research Center,
13, Golev St., Perm, 614081,
Russian Federation,
19katya991@rambler.ru
https://orcid.org/0000-0002-0670-3829

Anna D. Eliseeva,
Student,
Perm State University,
15, Bukirev St., Perm, 614068,
Russian Federation,
liamrik@list.ru
https://orcid.org/0000-0002-6990-1902

Vitaly A. Shchetko,
Cand. Sci. (Biology), Head of the Department «Research and Production Center for Biotechnology»,
Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,
2, Ak. Kuprevich St., Minsk, 220141,
Republic of Belarus,
vental@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-6322-5755

Alexander Yu. Maksimov,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Institute of Ecology and genetics of Microorganisms,
Perm Federal Research Center,
13, Golev St., Perm, 614081,
Russian Federation;
Associate Professor,
Perm State University,
15, Bukirev St., Perm, 614068,
Russian Federation,
almaks1@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-2591-335

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 23.01.2023.
Одобрена после рецензирования 18.07.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

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 23.01.2023.
Approved after reviewing 18.07.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 573.6
EDN: UMGJYE
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-370-381

Эффекты анионактивного поверхностно-активного вещества додецилсульфата натрия на адгезию клеток штамма *Micrococcus luteus* 1-и на поверхности углеродных материалов

М.Н. Саксонов*, Г.О. Жданова*, Д.И. Стом*,,***,****✉, С.В. Алферов****, А.Б. Купчинский**, Ю.Ю. Петрова*****, С.А. Сасим*, М.Ю. Толстой***, А.Д. Стом*, А.Н. Чеснокова***, Б.В. Кукшинов********

**Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация*
***Байкальский музей СО РАН, п. Листвянка, Российская Федерация*
****Иркутский национальный исследовательский технический университет, г. Иркутск, Российская Федерация*
*****Тульский государственный университет, г. Тула, Российская Федерация*
******Сургутский государственный университет, г. Сургут, Российская Федерация*
*******ФГБУ «Центр агрохимической службы «Иркутский», п. Дзержинск, Российская Федерация*

Аннотация. *Адгезия микроорганизмов на различных поверхностях играет важнейшую роль во многих биотехнологических процессах. Широко распространенным компонентом сточных вод является анионактивное поверхностно-активное вещество додецилсульфат натрия. Поверхностно-активные вещества оказывают большое влияние на все межфазные реакции, в том числе и в технологии микробных топливных элементов. Поэтому было изучено действие додецилсульфата натрия на сорбцию клеток штамма Micrococcus luteus 1-и, обладающего электрогенной активностью в микробных топливных элементах, на поверхности различных углеродсодержащих электродных материалов, применяемых в технологии биологических топливных элементов: 1) углеродная ткань; 2) углеродный войлок; 3) измельченные графитовые контактные троллейбусные вставки (летние); 4) березовый активированный уголь. С применением методов спектрофотометрии и микроскопии показано, что в условиях наших опытов присутствие додецилсульфата натрия в диапазоне концентраций 10–200 мг/л усиливало сорбцию клеток Micrococcus luteus 1-и на поверхностях испытуемых углеродных материалов. Максимальное увеличение сорбции за 2 ч экспозиции выявлено при внесении 100 мг/л этого поверхностно-активного вещества, оно составляло для березового активированного угля – 21%, для углеродной ткани – 26%, для углеродного войлока – 24% относительно контроля (без поверхностно-активного вещества). Продемонстрированная в работе достаточно эффективная адгезия клеток Micrococcus luteus 1-и на различных углеродных материалах, в том числе в присутствии довольно высоких концентраций додецилсульфата натрия, подтверждает перспективность данного штамма для применения в различных типах микробных топливных элементов.*

Ключевые слова: *адгезия микроорганизмов, Micrococcus luteus, углеродные материалы, додецилсульфат натрия*

Финансирование. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (РЦНИ) № 21-54-12022.*

Для цитирования: Саксонов М.Н., Жданова Г.О., Стом Д.И., Алферов С.В., Купчинский А.Б., Петрова Ю.Ю., Сасим С.А., Толстой М.Ю., Стом А.Д., Чеснокова А.Н., Кукшинов Б.В. Эффекты анионактивного поверхностно-активного вещества додецилсульфата натрия на адгезию клеток штамма *Micrococcus luteus* 1-и на поверхности углеродных материалов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 370–381. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-370-381. EDN: UMGJYE.

© Саксонов М.Н., Жданова Г.О., Стом Д.И., Алферов С.В., Купчинский А.Б., Петрова Ю.Ю., Сасим С.А., Толстой М.Ю., Стом А.Д., Чеснокова А.Н., Кукшинов Б.В., 2023

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Effects of the anionactive surfactant sodium dodecyl sulfate on the adhesion of cells of the strain *Micrococcus luteus* 1-i to the surface of carbon materials

Michael N. Saksonov*, Galina O. Zhdanova*, Devard I. Stom*,,***✉, Sergey V. Alferov****, Aleksander B. Kupchinsky**, Yuliya Yu. Petrova*****, Sergey A. Sasim*, Michail Yu. Tolstoy***, Alina D. Stom*, Alexandra N. Chesnokova***, Bayar V. Kukshinov********

**Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation*
***Baikal Museum of the SB RAS, Listvyanka, Russian Federation*
****Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation*
*****Tula State University, Tula, Russian Federation*
******Surgut State University, Surgut, Russian Federation*
*******FSBI "Center of Agrochemical Service "Irkutsk", Dzerzhinsk, Russian Federation*

Abstract. *The adhesion of microorganisms on various surfaces plays a crucial role in many biotechnological processes. A widespread component of wastewater is the anion-active surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS). Surfactants have a significant influence on all interfacial reactions, including those occurring in microbial fuel-cell technology. The work set out to study the effect of sodium dodecyl sulfate on the sorption of cells of the Micrococcus luteus 1 strain (which has electrogenic activity in microbial fuel cells) on the surface of various carbon-containing electrode materials used in biological fuel cell technology: 1) carbon tissue; 2) carbon felt; 3) crushed graphite contact trolleybus inserts (summer); 4) birch activated carbon. Using spectrophotometry and microscopy methods, the presence of sodium dodecyl sulfate in the concentration range of 10–200 mg/l was shown to increase the sorption of Micrococcus luteus 1-i cells on the surfaces of the tested carbon materials under experimental conditions. The maximum increase in sorption during 2 hours of exposure was detected when 100 mg/l of this surfactant was applied: for birch activated carbon – 21%; for carbon fabric – 26%; for carbon felt relative to the control (without surfactant) – 24%. The results demonstrate a sufficiently effective adhesion of Micrococcus luteus 1-i cells to various carbon materials, including in the presence of fairly high concentrations of sodium dodecyl sulfate, confirming the prospects of this strain for use in various types of microbial fuel cells.*

Keywords: *adhesion of microorganisms, Micrococcus luteus, carbon materials, sodium dodecyl sulfate*

Funding. *The reported study was funded by the RFBR grant 21-54-12022.*

For citation: Saksonov M.N., Zhdanova G.O., Stom D.I., Alferov S.V., Kupchinsky A.B., Petrova Yu.Yu., Sasim S.A., Tolstoy M.Yu., Stom A.D., Chesnokova A.N., Kukshinov B.V. Effects of the anionactive surfactant sodium dodecyl sulfate on the adhesion of cells of the strain *Micrococcus luteus* 1-i to the surface of carbon materials. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(3):370–381. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-370-381. EDN: UMGJYE.

ВВЕДЕНИЕ

Сорбция микроорганизмов играет важную роль в ряде биотехнологических областей. Адгезированные клетки микроорганизмов используют и в биотестировании [1–4], в том числе для детекции различных ионов в сточных водах применяют амперометрические биосенсоры на основе микробных топливных элементов (МТЭ) с иммобилизованными клетками и ферментами [5–9]. Сорбция нашла широкое применение и в процессах очистки загрязненных водных и почвенных сред в виде посаженных на носители-сорбенты микроорганизмов-биодеструкторов [10–15].

Большое значение процессы адгезии микроорганизмов играют и в технологии МТЭ – одной из перспективных в настоящее время областей альтернативной энергетики. МТЭ позволяют избавляться от поллютантов и одновременно генерировать электрический ток [16–18]. В получении электрической энергии микроорганизмами в ходе окисления органических веществ важнейшим фактором является способность передачи микроорганизмами электронов от субстрата к электроду [19]. Показано, что одним из наиболее распространенных и технологичных способов такой передачи является прямой перенос. В этом случае бактериальные клетки должны прямо прикрепляться к поверхности электрода и в таком состоянии осуществлять передачу электрона. Но на сегодняшний день очень важным и недостаточно изученным аспектом остаются исследования механизмов взаимодействия микроорганизмов с поверхностями, на которых они адсорбируются. Существует острая необходимость в выяснении зависимостей этих процессов от характера поверхности (материал электрода, его пористость, гидрофобность/гидрофильность, компонентный состав, заряд и т.д.), а также от воздействия на эти процессы различных факторов среды.

Значительное влияние на сорбцию микроорганизмов на твердых поверхностях может оказывать наличие в среде поверхностно-активных веществ (ПАВ) [20–22]. Они

адсорбируются на межфазных поверхностях и тем самым изменяют их характеристики. Кроме того, ПАВ являются одними из наиболее распространенных загрязнителей воды. Поэтому можно ожидать, что они могут существенно менять работу МТЭ при утилизации сточных вод [23].

Из ПАВ особенно часто в составе различных препаратов используется анионоактивный ПАВ додецилсульфат натрия (ДСН). В связи с вышесказанным целью данного исследования явилось изучение сорбции клеток электрогенного штамма *Micrococcus luteus* 1-и на различных электродных материалах, применяемых в МТЭ, под влиянием ДСН.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактерии. Объектом исследования являлся штамм *Micrococcus luteus* 1-и. Ранее он был выделен нами из активного ила очистных сооружений нефтеперерабатывающего предприятия. Штамм продемонстрировал довольно высокую электрогенную активность в МТЭ [24, 25]. Он депонирован во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (ВКМ) под номером ВКМ Ac-2637 D.

Поверхностно-активные вещества. Испытуемым ПАВ являлся представитель анионоактивных ПАВ натрия додецилсульфат (х.ч.; ЗАО «Вектон», Россия) – натриевая соль лаурилсерной кислоты (рис. 1).

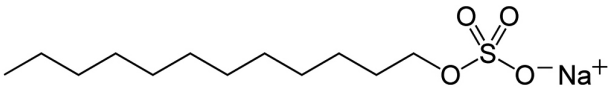


Рис. 1. Структурная формула додецилсульфата натрия

Fig. 1. Structural formula of sodium dodecyl sulfate

Это ПАВ широко используется в качестве высокоэффективного детергента в промышленности, в быту, в частности в процессах очистки от загрязнений. Растворы ПАВ (10, 100, 200, 400, 800 мг/л) для экспериментов готовили на физиологическом растворе (приготовленном на дистиллированной воде).

Углеродные материалы. Сорбцию клеток *M. luteus* 1-и изучали на различных материалах, применяемых в качестве электродов в МТЭ:

1) углеродная ткань «Урал Т22Р» (ОАО «СветлогорскХимволокно», Республика Беларусь) широко используется во многих типах МТЭ (почвенные МТЭ, безмембранные МТЭ бентосного типа, растительно-микробные ТЭ (рМТЭ), фотоМТЭ). Ее применяют как в качестве анодных, так и катодных электродов. Характеристики исследуемой в данной работе углеродной ткани (средний показатель по партии): толщина – 0,36 мм; удельная плотность волокна – 1,43 г/м^2; удельное поверхностное электрическое сопротивление – 0,4 Ом; количество нитей – 25 мм (основы – 46, утка – 38); pH водной вытяжки – 8, массовая доля золы – 0,8%, влажность – 0,5%;

2) углеродный войлок «Карбопон-В-22» (ОАО «СветлогорскХимволокно», Республика Беларусь) также применим для всех типов МТЭ. Средний показатель по партии: удельная разрывная нагрузка – не менее 0,06 Н/мм^2; удельное поверхностное электрическое сопротивление – не более 0,5 Ом; содержание углерода – не менее 99,5%;

3) измельченные угольные контактные троллейбусные вставки (летние) ВТЛ (АО «НИИЭИ», Россия) перспективны в качестве анодного электрода (слоя) в рМТЭ, для применения в рМТЭ – троллейбусные угольные вставки (ТУВ), представляющие собой бруски длиной 8,5 см. Основные характеристики вставок (нормативный документ ТУ 303-90 ИЛЕА. 753353.018ТУ): удельное электрическое сопротивление – не более 300 Ом·мм^2/м; модуль упругости – не менее 10000 кгс/мм^2; твердость – не менее 25 Н/м. Вставки измельчали в шаровой мельнице до фракции размером 4–7 мм;

4) березовый активированный уголь «БАУ А» (ЗАО «Вектон», Россия) (ГОСТ 6217-74). Этот углеродный сорбент также применяется в рМТЭ в качестве анодного слоя (электрода).

Изучение сорбции клеток M. luteus 1-и на углеродных материалах спектрофотометрическим методом. Сорбцию клеток *M. luteus* 1-и на указанных материалах изучали по изменению оптической плотности бактериальных суспензий при экспозиции в них испытуемых электродных образцов. Для этого электродный материал обрабатывали микроорганизмами в двух разных вариантах.

Вариант 1. Навеску исследуемого материала (0,5; 1 или 2 г – в зависимости от сорбирующего материала) помещали в колбу (объемом 50 мл), заливали 20 мл испытуемого раствора ПАВ (в контроле – физиологического раствора без ПАВ). Затем туда добавляли микроорганизмы таким образом, чтобы начальная оптическая плотность бактериальной суспензии составляла 0,75. Смеси в колбах инкубировали на орбитальном шейкере BIOSAN OS-20 (Biosan, Латвия), скорость перемешивания составила 80 об/мин в течение 2 ч. После этого бактериальную суспензию отделяли от углеродных материалов фильтрацией через мельничный газ (размер ячейки – 0,064×0,064 мм). Затем определяли оптическую плотность суспензии ($D_ф$). Далее образцы исследуемых сорбирующих материалов отмывали 20 мл физиологического раствора с повторной фильтрацией через мельничный газ и измерением оптической плотности ($D_{от}$). Способ позволял оценить сорбцию бактериальных клеток при постоянном перемешивании.

Вариант 2. Навеску сорбента выдерживали в суспензии бактерий без перемешивания, используя для этого стеклянные колонки (диаметр – 14 мм, длина – 140 мм). Навеску углеродного материала (0,5; 1 или 2 г – в зависимости от сорбирующего материала) помещали в колонку. Ее заливали испытуемым раствором ПАВ объемом 20 мл. Как и в первом способе, время экспозиции составляло 2 ч. По истечении этого времени суспензию сливали и спектрофотометрировали ($D_ф$). Затем для отмыва неадсорбированных (оставшихся в толще суспензии) клеток микроорганизмов в колонки с сорбентом наливали 20 мл физиологического раствора. После этого измеряли оптическую плотность ($D_{от}$) суспензии клеток, отмытых от сорбента.

В обоих вариантах определяли оптическую плотность полученного фильтрата на спектрофотометре ПЭ-5300В (ООО «Промышленные Экологические Лаборатории», Россия) при длине волны 540 нм и кювете 10 мм. Контролем служила суспензия бактериальных клеток, контактировавшая с сорбентом в отсутствии ДСН.

Полученные данные сопоставляли с оптической плотностью исходной бактериальной суспензии, взятой в опыт ($D_{исх}$), по следующей формуле:

$$A = \frac{D_{исх} - (D_ф + D_{от})}{D_{исх}} \times 100\%, \quad (1)$$

где $D_{исх}$ – исходная оптическая плотность бактериальной суспензии (D_{540} = 0,75 ед.); $D_ф$ – оптическая плотность бактериальной суспензии после фильтрации; $D_{от}$ – оптическая плотность бактериальной суспензии после отмыва углеродного материала; А – сорбция бактерий на углеродном материале.

Определение удельной массы клеток M. luteus 1-и. Массу сухих клеток в 1 мл суспензии устанавливали спектрофотометрическим методом. Для определения 5 пробирок типа Эппендорф взвешивали на аналитических весах. В пробирки вводили по 1 мл суспензии клеток *M. luteus* 1-и (с оптической плотностью 0,860) и центрифугировали при 11,8 тыс. об/мин на центрифуге Microspin12 (Biosan, Латвия). После центрифугирования клетки осаждали. Пробирки вместе с образовавшимся осадком помещали в термостат ТСО-80/1 (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) для высушивания клеток. Температура высушивания составила 30 °С. Далее вновь измеряли массу пробирок на аналитических весах Ohaus PR124 (Ohaus, США), определяя массу высушенного остатка. Измерения показали, что в 1 мл суспензии с оптической плотностью 0,860 опт. ед. содержалось 0,34 мг сухой бактериальной массы. Массу сухих клеток в 1 мл суспензии до адгезии рассчитывали по формуле (2), а массу сухих адсорбированных клеток – по формуле (3):

$$m = \frac{d_{исх.} \times 0{,}34}{0{,}860} \text{ мг/л}, \quad (2)$$

$$x = \frac{d_{исх.} - d_{фильтр.} - d_{промыв.}}{d_{исх.}} \times V \times m, \quad (3)$$

где x – масса адсорбированных клеток, мг; $d_{исх.}$ – оптическая плотность суспензии до адсорбции; $d_{фильтр.}$ – оптическая плотность суспензии после фильтрации; $d_{промыв.}$ – оптическая плотность суспензии после отмыва от сорбента; m – концентрация сухих клеток до адсорбции, мг/л; V – объем суспензии, из которого адсорбировали клетки.

При этом прямая зависимость концентрации клеток от оптической плотности бактериальной суспензии наблюдалась в диапазоне 0,012–0,860 опт. ед.

Микроскопический анализ сорбции клеток M. luteus 1-и на углеродной ткани. С применением микроскопической техники оценивали влияние ДСН на прикрепление клеток к поверхности углеродных волокон. Для этого на основе физиологического раствора готовили растворы ДСН (10, 50, 100, 250, 500 мг/л). В 10 мл испытуемого раствора помещали нить углеродной ткани длиной 1 см и вносили 1-суточную культуру *M. luteus*. Контролем служила проба, приготовленная без добавления ПАВ (т.е. физиологический раствор). Полученные образцы экспонировали в течение 2 ч. По истечении этого времени нити углеродной ткани извлекали из растворов, промывали в физиологическом растворе и микроскопировали при увеличении ×50 на поляризационном микроскопе Olympus BX53P (Olympus Corp., Япония).

Статистическая обработка данных. Все приводимые в работе цифровые значения сорбции получены не менее чем в 3-х независимых опытах, выполненных в 3-х повторностях. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в программах Statistica и Windows Excel. Выводы сделаны при вероятности безошибочного прогноза P≥0,95.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные эксперименты выявили следующее. Анионоактивный ПАВ додецилсульфат натрия в определенных концентрациях повышал адгезию клеток *M. luteus* 1-и на всех испытуемых материалах. Наиболее активно сорбция *M. luteus* 1-и протекала на березовом активированном угле при концентрациях ДСН 100 мг/л при экспозиции в колбах и при 200 мг/л в колонках.

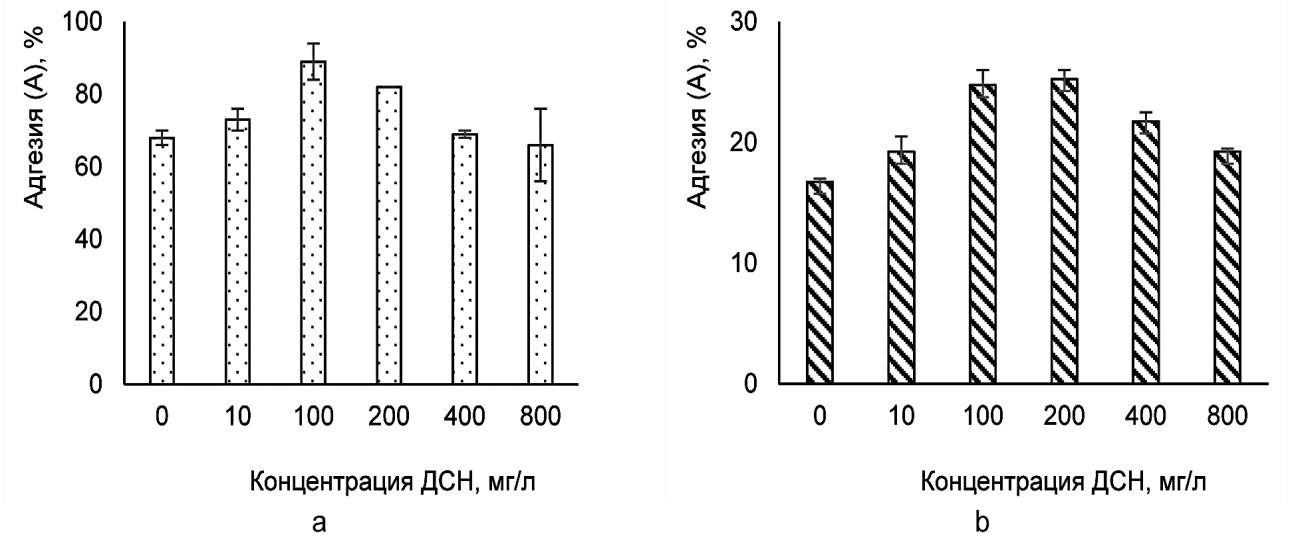


Рис. 2. Адгезия (%) клеток штамма *M. luteus* 1-и на березовом активированном угле в присутствии додецилсульфата натрия (навеска березового активированного угля 1 г, t = 20 °С); a – экспозиция в колбах на орбитальном шейкере (80 об/мин), b – экспозиция в колонках

Fig. 2. Adhesion (%) of *M. luteus* 1-i strain cells on birch activated carbon in the presence of sodium dodecyl sulfate (1 g of activated carbon sample, t = 20 °C); a – exposure in flasks on an orbital shaker (80 rpm), b – exposure in columns

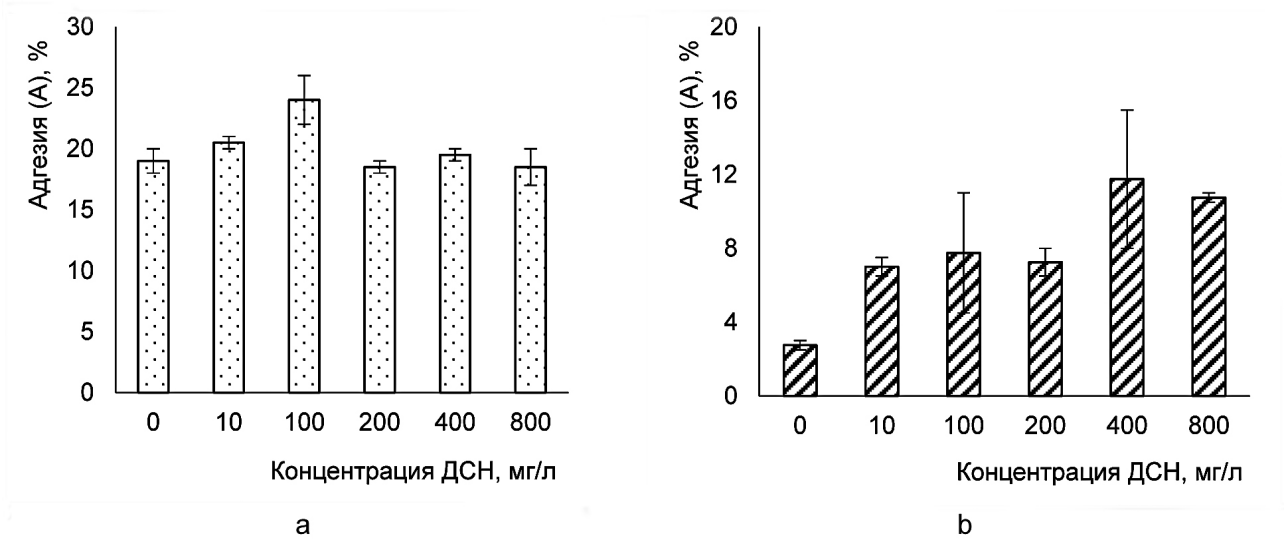


Рис. 3. Адгезия (%) клеток штамма *M. luteus* 1-и на взвесях, полученных из дробленых троллейбусных угольных вставок, в присутствии додецилсульфата натрия (навеска троллейбусных угольных вставок 2 г, t = 20 °C); a – экспозиция в колбах на орбитальном шейкере (80 об/мин), b – экспозиция в колонках

Fig. 3. Adhesion (%) of *M. luteus* 1-i strain cells on suspensions obtained from crushed trolleybus coal inserts in the presence of sodium dodecyl sulfate (sorbent sample 2 g, t = 20 °C); a – exposure in flasks on an orbital shaker (80 rpm), b – exposure in columns

В первом случае она достигала 89±5% (рис. 2, *a*), во втором – 25±1% (рис. 2, *b*). Эти значения превышали в 1,5 и 1,3 раза контроль (т.е. без добавления ПАВ). При самой высокой из всех взятых в опыт концентраций испытуемого ПАВ, равной 800 мг/л, количество микробных клеток, сорбировавшихся на поверхности угля, не отличалось от контроля (рис. 2).

На взвесях, полученных из дробленых ТУВ, адгезия клеток штамма *M. luteus* 1-и при экспозиции с перемешиванием (в колбе, на орбитальном шейкере) и без перемешивания (опыт в колонках) была различной. Так, максимум сорбции бактериальных клеток к этому сорбенту при экспозиции в колонках был достигнут при концентрации ДСН 400 мг/л (12±4%; рис. 3, *b*), а в условиях перемешивания (экспозиция в колбах) – при 100 мг/л (24±2%; рис. 3, *a*). В то же время как адгезия в контроле (в отсутствии ПАВ) в указанных вариантах опыта составляла 2,8 (см. рис. 3, *b*) и 19% (см. рис. 3, *a*) соответственно. Как и в экспериментах с березовым активированным углем, негативного действия ДСН на сорбцию клеток *M. luteus* не было выявлено во всем исследуемом диапазоне его концентраций (от 10 до 800 мг/л) (рис. 3).

Как и в описанных выше экспериментах, количество клеток *M. luteus,* сорбировавшихся на углеродной ткани (рис. 4), повышалось при добавлении определенных концентраций ДСН. Так, при экспозиции углеродного сорбента в бактериальной суспензии в условиях постоянного перемешивания (в колбах на орбитальном шейкере) наибольшую сорбцию бактерий наблюдали в присутствии 10 и 100 мг/л ПАВ. Значение сорбции при этом

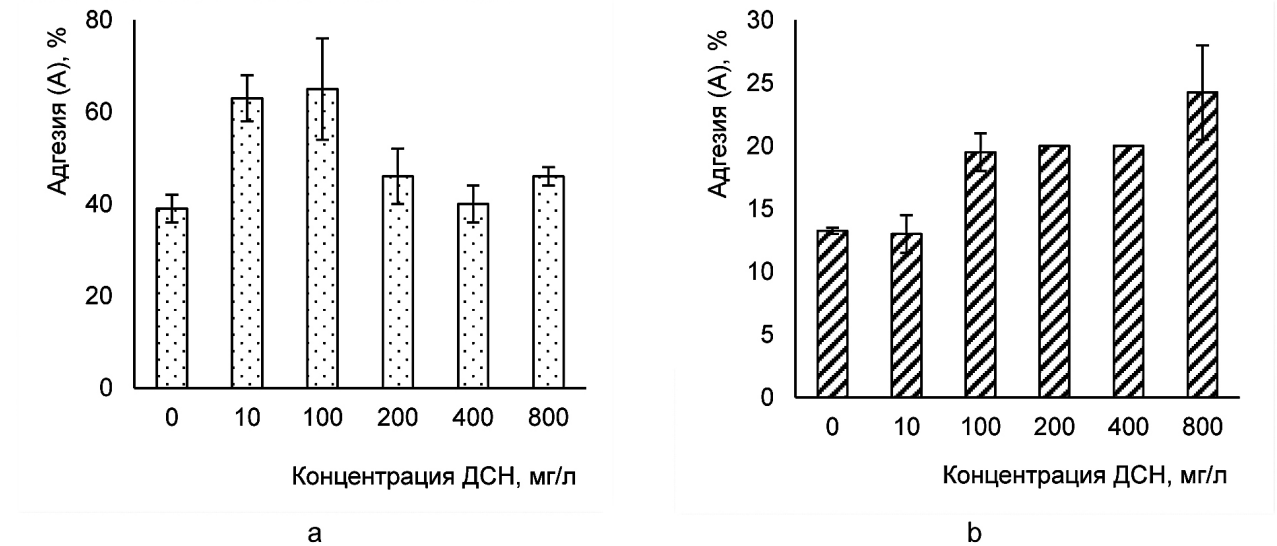
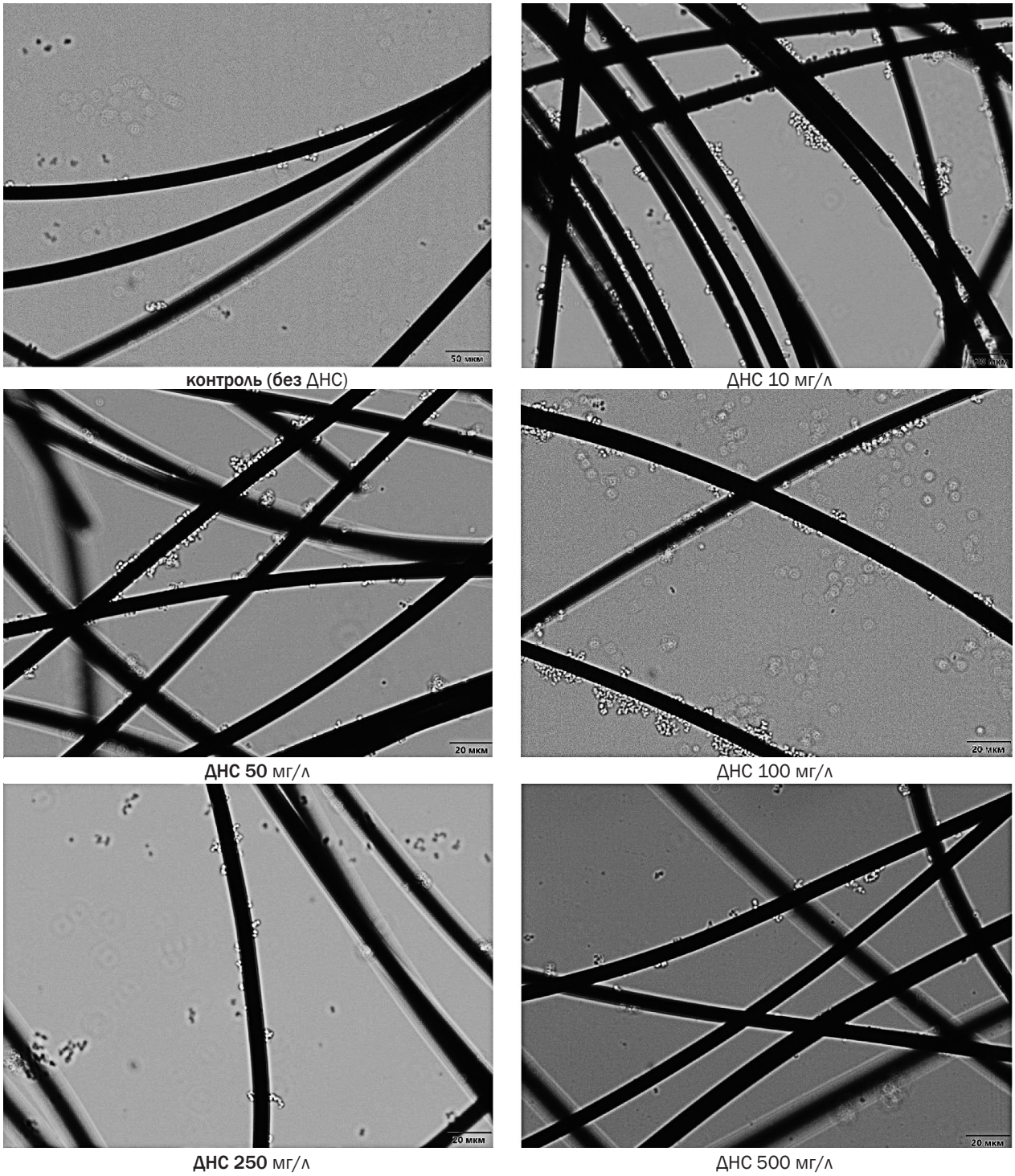


Рис. 4. Адгезия (%) клеток штамма *M. luteus* 1-и на углеродной ткани в присутствии додецилсульфата натрия (навеска ткани 1 г, t = 20 °C); a – экспозиция в колбах на орбитальном шейкере (80 об/мин), b – экспозиция в колонках

Fig. 4. Adhesion (%) of *M. luteus* 1-i strain cells on carbon tissue in the presence of sodium dodecyl sulfate (1 g sample of tissue, t = 20 °C); a – exposure in flasks on an orbital shaker (80 rpm), b – exposure in columns

составило 63 и 65±11% соответственно. Это в 1,6 раза превышало сорбцию штамма в контроле (39%), т.е. без добавления ПАВ. Внесение ДСН в концентрациях 200, 400 и 800 мг/л не вызывало изменения способности клеток *M. luteus* к адгезии на углеродной ткани. Об этом свидетельствовала равная степень сорбции бактериальных клеток в отсутствии (контроль) и присутствии указанных концентраций ПАВ (рис. 4, *а*).

При взаимодействии образцов углеродной ткани с бактериальной суспензией без перемешивания (экспозиция в колонках) максимальная степень сорбции клеток *M. luteus* была достигнута при добавлении



контроль (без ДНС)
ДНС 10 мг/л
ДНС 50 мг/л
ДНС 100 мг/л
ДНС 250 мг/л
ДНС 500 мг/л

Рис. 5. Клетки штамма *M. luteus* 1-и, адгезированные на углеродных волокнах за 2 ч экспонирования в физиологическом растворе с добавлением додецилсульфата натрия 10, 50, 100, 250 и 500 мг/л (поляризационный микроскоп Olympus BX53P, увеличение в 500 раз)

Fig. 5. Cells of strain *M. luteus* 1-i, adhered to carbon fibers for 2 hours of exposure in saline with the addition of sodium dodecyl sulfate 10, 50, 100, 250 and 500 mg/l (polarizing microscope Olympus BX53P, magnification 500 times)

800 мг/л ДСН. В этом случае адгезия достигала 24±4%, в то время как в контроле (без ПАВ) – лишь 13%. В диапазоне концентраций ДСН от 100 до 400 мг/л количество сорбированных на ткани клеток (20%) также превышало контрольное значение. Добавление 10 мг/л испытуемого анионоактивного ПАВ не оказывало какого-либо действия на сорбцию клеток *M. luteus* на углеродной ткани (рис. 4, *b*).

Усиление сорбции клеток *M. luteus* на углеродной ткани под действием 10–100 мг/л ДСН подтверждено нами и микроскопическим методом. Микрофотографии, представленные на рис. 5, наглядно иллюстрируют значительно большее по сравнению с контролем количество клеток, прикрепленных к углеродным волокнам в присутствии указанных концентраций ДСН (см. рис. 5).

При использовании углеродного войлока в качестве сорбента было показано, что адгезия исследуемого штамма при экспозиции в колбах с перемешиванием достигала 98% при концентрации ДСН 100 мг/л. Это на 24% превышало сорбцию микробных клеток в отсутствии ПАВ. При содержании ПАВ 10, 200, 400 и 800 мг/л показатели сорбции колебались на уровне 77–86% и достоверно не отличались от контроля, т.е. без добавления ПАВ – 74% (рис. 6, *a*).

В опытах, в которых углеродный войлок выдерживали в бактериальной суспензии в колонках, сорбция клеток была значительно ниже (рис. 6, *b*), чем при экспозиции в колбах (на орбитальном шейкере) (см. рис. 6, *a*). При этом внесение 10 мг/л ДСН приводило к снижению сорбции *M. luteus* в 1,6 раза по сравнению с контролем. В присутствии 100, 200, 400 и 800 мг/л этого ПАВ выраженных эффектов ДСН на сорбцию клеток *M. luteus* зафиксировать не удалось (см. рис. 6, *b*).

Как и следовало ожидать, полученные результаты в целом указывают на более интенсивную сорбцию микроорганизмов при экспозиции сорбента в бактериальной суспензии при непрерывном перемешивании (в колбах на орбитальном шейкере), чем без перемешивания (экспозиция в колонках). На всех испытанных углеродных сорбентах в присутствии и отсутствии ДСН во всех концентрациях адгезия в колбах превышала таковую в колонках. Так, в опыте с БАУ она была выше в 4 раза, с ТУВ – в 7 раз, с углеродной тканью – в 3 раза, с углеродным войлоком – в 2,3 раза.

Для сопоставления сорбционной активности испытуемых углеродных материалов определяли удельную массу клеток (мг), сорбировавшихся на 1 г сорбента. Результаты проведенных опытов показали следующее. По отношению к клеткам *M. luteus* 1-и максимальная сорбционная емкость БАУ и углеродной ткани была значительно выше (в 3–5 раз), чем емкость ТУВ (рис. 7). При этом наибольшее количество клеток сорбировалось на углеродной ткани. Удельная масса клеток *M. luteus*, сорбированных на этом носителе, составляла 3,24 мг/г, на активированном угле – 2,32 мг/г, на измельченных ТУВ – 0,65 мг/г (см. рис. 7).

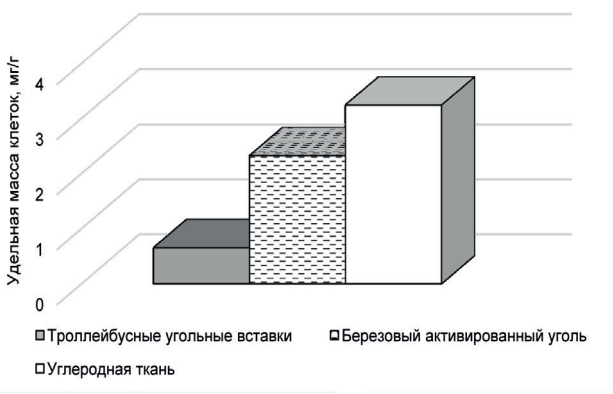


Рис. 7. Удельная масса (мг/г) клеток штамма *M. luteus,* сорбированных на испытуемых углеродных материалах (время экспозиции – 2 ч)

Fig. 7. Specific gravity (mg/g) of *M. luteus* cells adsorbed on the tested carbon materials (exposure time – 2 h)

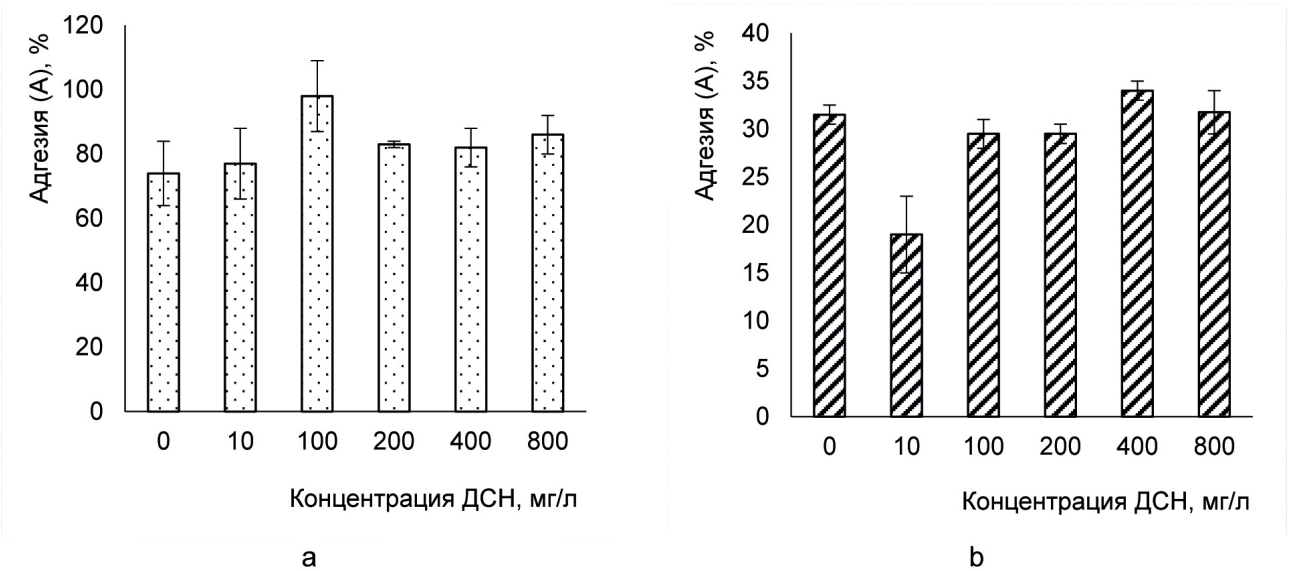


Рис. 6. Адгезия (%) клеток штамма *M. luteus* 1-и на углеродном войлоке в присутствии додецилсульфата натрия (навеска войлока 0,5 г, t = 20 °C); a – экспозиция в колбах на орбитальном шейкере (80 об/мин), b – экспозиция в колонках

Fig. 6. Adhesion (%) of *M. luteus* 1-i strain cells on carbon felt in the presence of sodium dodecyl sulfate (0.5 g of felt, t = 20 °C); a – exposure in flasks on an orbital shaker (80 rpm), b – exposure in columns

Таким образом, в условиях наших опытов углеродная ткань по удельной сорбции по отношению к клеткам штамма *M. luteus* 1-и не уступала активированному углю. Несколько иного характера материал получен ранее А. Ю. Максимовым с соавторами. В их опытах применение активированных углей в качестве носителей для иммобилизации штамма *R. ruber* gt. 1 более предпочтительно, чем использование волокнистых углеродных материалов [26].

Отмеченное выше положительное действие определенных концентраций ДСН на сорбцию бактерий *M. luteus* 1-и на БАУ, углеволокнистом войлоке и углеродной ткани согласуется с результатами других авторов. Например, схожие эффекты были описаны в работе [27] при исследованиях с бактериальным штаммом *Pseudomonas aeruginosa*. В этом случае под действием ДСН в концентрации, соответствующей критической концентрации мицеллообразования (8,3 мМ/л), величина адсорбции бактерий на поверхности углеродных сорбентов увеличивалась. Авторы предположили, что, возможно, это связано с тем, что поверхность углеродных сорбентов имеет отрицательный заряд, а ДСН является анионным ПАВ с положительным зарядом, что может увеличить адсорбционную способность бактерий на поверхности сорбентов [27]. К аналогичным выводам приходили и другие исследователи [28–30].

Авторами работы [31] показано, что легко биоразлагаемые анионные ПАВ децилсульфат натрия и додецилсульфат натрия в отдельных опытах вызывали увеличение числа прикрепленных бактерий и сопутствующее уменьшение числа взвешенных клеток микроорганизмов. По мере прогрессирования биодеградации ПАВ эти тенденции менялись на противоположные, и бактериальные популяции в исследуемом микрокосме возвращались к своим исходным характеристикам.

Исходя из самой природы ПАВ, эти вещества способны модифицировать физико-химические свойства поверхностей. Данная их особенность должна (при определенных концентрациях) снижать сорбцию микроорганизмов к ним [32]. Большинство исследователей наблюдали негативное действие анионоактивного ПАВ додецилсульфата натрия на способность микробных клеток адсорбироваться на различных поверхностях. В частности, продемонстрировано ингибирование прикрепления клеток *Staphylococcus aureus* к поверхности стекла под действием ДСН [33].

Подобные эффекты наблюдали не только с анионактивным ДСН, но и с другими ПАВ. Например, М. Содагари и др. [34] обнаружили, что анионный биосурфактант рамнолипид при содержании от 10 до 200 мг/л снижал гидрофобность клеточной поверхности грамотрицательных *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* и грамположительных *Bacillus subtilis*. Он уменьшал и прикрепление этих 4-х бактерий как к гидрофильному, так и к гидрофобизированному стеклу.

М.Дж. Гросс, Б.Э. Логан показали, что ДСН (0,01%) вызывал значительное снижение гидрофобности клеточной поверхности и степени прикрепления клеток *Alcaligenes paradoxus* к поверхности стеклянных шариков [35]. Ю. Шен и соавторы продемонстрировали, что ДСН значительно ингибирует образование биопленки грамположительных бактерий (*Staphylococcus aurues* и *Streptococcus mutans*) в концентрациях 0,31 мг/мл и выше [36]. Сорбция молекул ДСН вызывала изменения в гидрофобности поверхностей из стекла и полиэтилена и, следовательно, снижение адгезии клеток *S. aureus* [33].

Х. Чжун с соавторами [37] и Джи. Лю с коллегами [38] сообщали, что рамнолипид в низкой концентрации снижал степень удержания *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 на стеклянных шариках и кварцевом песке. Они отнесли это за счет понижения гидрофобности клеточной поверхности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По отношению к клеткам *M. luteus* 1-и максимальная удельная сорбция БАУ и углеродной ткани при перемешивании на орбитальном шейкере была значительно выше (в 2,5–4 раза), чем емкость измельченных ТУВ. При этом в условиях наших опытов углеродная ткань по величине удельной сорбции по отношению к клеткам штамма *M. luteus* 1-и не уступала активированному углю. Более интенсивная сорбция клеток микроорганизмов происходила при экспозиции сорбента в бактериальной суспензии при постоянном перемешивании (экспозиция в колбах на орбитальном шейкере при 80 об/мин), чем без перемешивания.

Присутствие анионоактивного ПАВ додецилсульфата натрия в диапазоне концентраций 10–200 мг/л усиливало сорбцию клеток *M. luteus* 1-и на поверхностях углеродного войлока, графита, активированного угля при экспозиции сорбента в бактериальной суспензии при постоянном перемешивании. Максимальное увеличение сорбции выявлено при внесении 100 мг/л этого ПАВ и составляло для березового активированного угля – 21%, углеродной ткани – 26%, углеродного войлока – 24% относительно контроля (без ПАВ). При экспозиции углеродных сорбентов без перемешивания (выдерживание в колонках) повышение числа адгезированных клеток происходило при еще более высоких концентрациях ДСН – до 800 мг/л. Это позволяет ожидать, что функционирование испытуемого штамма в МТЭ будет эффективным как в условиях проточного, так и периодического культивирования.

Испытанный в работе детергент очень часто встречается в составе сточных вод самых различных типов – как бытовых, так и промышленных. Это неизбежно приводит к его контакту с биологическими объектами в биотехнологических процессах очистки сточных вод. В том числе от присутствия ПАВ в значительной степени будут зависеть процессы генерирования электрического тока при очистке сточных вод в МТЭ, т.к. они в значительной степени определяются взаимодействием микробных клеток с поверхностями электродов. Показанная в экспериментах высокая степень адгезии клеток *Micrococcus luteus* 1-и на различных углеродных материалах, в том числе в присутствии довольно высоких концентраций ДСН, подтверждает перспективность данного штамма для применения в различных типах МТЭ.

REFERENCES

1. Lobakova E.S., Aleskerova L.E., Orlova A.A., Vasil'eva S.G., Ismailov A.D. Effect of polyethylenimine-based sorbents on the luminescence of photobacteria. *Microbiology.* 2017;86:155-157. https://doi.org/10.1134/S002626171701009X.

2. Hurtado-Gallego J., Pulido-Reyes G., González-Pleiter M., Fernández-Piñas F. Luminescent microbial bioassays and microalgal biosensors as tools for environmental toxicity evaluation. In: *Handbook of Cell Biosensors.* Springer, Cham; 2022. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23217-7_89.

3. Hussain F., Ashun E., Jung S.P., Kim T., Lee S.-H., Kim D.-J., et al. A direct contact bioassay using immobilized microalgal balls to evaluate the toxicity of contaminated field soils. *Journal of Environmental Management.* 2022;321:115930. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115930.

4. Hamimed S., Mahjoubi Y., Abdeljelil N., Gamraoui A., Othmani A., Barhoum A., et al. *Chemical sensors and biosensors for soil analysis: principles, challenges, and emerging applications.* Elsevier; 2023, p. 669-698. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90222-9.00014-5.

5. Habermüller K., Mosbach M., Schuhmann W. Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry.* 2000;366:560-568. https://doi.org/10.1007/s002160051551.

6. Goswami P. *Advanced materials and techniques for biosensors and bioanalytical applications.* Boca Raton, CRC Press, 2020. 314 p. https://doi.org/10.1201/9781003083856.

7. Mohan J.M., Amreen K., Javed A., Dubey S.K., Goel S. Emerging trends in miniaturized and microfluidic electrochemical sensing platforms. *Current Opinion in Electrochemistry.* 2022;33:100930. https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100930.

8. Andriukonis E., Celiesiute-Germaniene R., Ramanavicius S., Viter R., Ramanavicius A. From microorganism-based amperometric biosensors towards microbial fuel cells. *Sensors.* 2021;21(7):2442. https://doi.org/10.3390/s21072442.

9. Schachinger F., Chang H., Scheiblbrandner S., Ludwig R. Amperometric biosensors based on direct electron transfer enzymes. *Molecules.* 2021;26(15):4525. https://doi.org/10.3390/molecules26154525.

10. Alvarino T., Lema J., Omil F., Suárez S. Trends in organic micropollutants removal in secondary treatment of sewage. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology.* 2018;17:447-469. https://doi.org/10.1007/s11157-018-9472-3.

11. Stom D.I., Konovalov A.S., Butyrin M.V., Tyutyunin V.V., Saksonov M.V., Penzina T.A. Change in toxicity of model arsenic contaminant in the presence of humates and activated zeolites. *Modern Applied Science.* 2015;9(1):223-230. https://doi.org/0.5539/mas.v9n1p223.

12. Kureel M.K., Geed S.R., Giri B.S., Rai B.N., Singh R.S. Biodegradation and kinetic study of benzene in bioreactor packed with PUF and alginate beads and immobilized with *Bacillus* sp. M3. *Bioresource Technology.* 2017;242:92-100. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.167.

13. Scaffaro R., Lopresti F., Catania V., Santisi S., Cappello S., Botta L., et al. Polycaprolactone-based scaffold for oil-selective sorption and improvement of bacteria activity for bioremediation of polluted water: porous PCL system obtained by leaching melt mixed PCL/PEG/NaCl composites: oil uptake performance and bioremediation efficiency. *European Polymer Journal.* 2017;91:260-273. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.015.

14. Chen Y., Yu B., Lin J., Naidu R., Chen Z. Simultaneous adsorption and biodegradation (SAB) of diesel oil using immobilized *Acinetobacter venetianus* on porous material. *Chemical Engineering Journal.* 2016;289:463-470. https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.01.010.

15. Lin J., Gan L., Chen Z., Naidu R. Biodegradation of tetradecane using *Acinetobacter venetianus* immobilized on bagasse. *Biochemical Engineering Journal.* 2015;100:76-82. https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.04.014.

16. Khandaker Sh., Das S., Hossain Md.T., Islam A., Miah M.R., Awual Md.R. Sustainable approach for wastewater treatment using microbial fuel cells and green energy generation – a comprehensive review. *Journal of Molecular Liquids.* 2021;344:117795. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117795.

17. Boas J.V., Oliveira V.B., Simões M., Pinto A.M.F.R. Review on microbial fuel cells applications, developments and costs. *Journal of Environmental Management.* 2022;307:114525. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114525.

18. Ramya M., Kumar P.S. A review on recent advancements in bioenergy production using microbial fuel cells. *Chemosphere.* 2022;288:132512. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132512.

19. Thapa B.S., Kim T., Pandit S., Song Y.E., Afsharian Y.P., Rahimnejad M., et al. Overview of electroactive microorganisms and electron transfer mechanisms in microbial electrochemistry. *Bioresource Technology.* 2022;347:126579. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126579.

20. Nielsen C.K., Kjems J., Mygind T., Snabe T., Meyer R.L. Effects of Tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media. *Frontiers in Microbiology.* 2016;22(7):1878. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01878.

21. Vaccari L., Allan D.B., Sharifi-Mood N., Singh A.R., Leheny R.L., Stebe K.J. Films of bacteria at interfaces: three stages of behavior. *Soft Matter.* 2015;11:6062-6074. https://doi.org/10.1039/c5sm00696a.

22. Qi L., Christopher G.F. Effects of non-ionic surfactant on the formation of pellicles by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rheologica Acta.* 2022;61:59-68. https://doi.org/10.1007/s00397-021-01313-0.

23. Zhang Y., Jiang J., Zhao Q., Gao Y.Zh., Wang K., Ding J., et al. Accelerating anodic biofilms formation and electron transfer in microbial fuel cells: role of anionic biosurfactants and mechanism. *Bioelectrochemistry.* 2017;117:48-56. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.06.002.

24. Konovalova E.Yu., Barbora L., Chizhik K.I., Stom D.I. *Micrococcus luteus* and *Serratia marcescens*, as a new association of bioagents for microbial fuel cells. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020;408:012080. https://doi.org/10.1088/1755-1315/408/1/012080.

25. Kuznetsov A.V., Khorina N.N., Konovalova E.Yu., Amsheev D.Yu., Ponamoreva O.N., Stom D.I. Bioelectrochemical processes of oxidation of dicarboxylic amino acids by strain *Micrococcus luteus* 1-I in a biofuel cell. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021;808:012038.
https://doi.org/10.1088/1755-1315/808/1/012038.

26. Maksimov A.Yu., Maksimova Yu.G., Kuznetsova M.V., Olontsev V.F., Demakov V.A. Immobilization of *Rhodococcus ruber* Strain gt1, possessing nitrile hydratase activity, on carbon support. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2007;43(2):193-198.
https://doi.org/10.1134/S000368380702007X. EDN: LKSIVV.

27. Wu H., Liu X., Shi Ch., Yang J., Yang Z., Zhao Sh. Action modes of surfactants on biodegradation of Wudong low-rank coal by *Pseudomonas aeruginosa*. *Research Square.* 2022.
https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1410150/v1.

28. Li Q., Logan B.E. Enhancing bacterial transport for bioaugmentation of aquifers using low ionic strength solutions and surfactants. *Water Research.* 1999;33(4):1090-1100.
https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00291-7 .

29. Powelson D.K., Mills A.L. Water saturation and surfactant effects on bacterial transport in sand columns. *Soil Science.* 1998;163(9):694-704.

30. Streger S.H., Vainberg S., Dong H., Hatzinger P.B. Enhancing transport of *Hydrogenophaga flava* ENV735 for bioaugmentation of aquifers contaminated with methyl tert-butyl ether. *Applied and Environmental Microbiology.* 2002;68(11):5571-5579.
https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5571-5579.2002.

31. Marchesi J.R., Russell N.J., White G.F., House W.A. Effects of surfactant adsorption and biodegradability on the distribution of bacteria between sediments and water in a freshwater microcosm. *Applied and Environmental Microbiology.* 1991;57(9):2507-2513.
https://doi.org/0099-2240/91/092507-07$02.00/0.

32. Janek T., Lukaszewicz M., Krasowska A. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. *BMC Microbiology.* 2012;12:24.
https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-24.

33. Koubali H., Latrache H., Zahir H., El Louali M. Kinetics of adhesion *Staphylococcus aureus* on glass in the presence of sodium lauryl sulfate. *Journal of Surfactants and Detergents.* 2021;24(3):483-490.
https://doi.org/10.1002/jsde.12484.

34. Sodagari M., Wang H., Newby B.Z., Ju L.K. Effect of rhamnolipids on initial attachment of bacteria on glass and octadecyltrichlorosilane-modified glass. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2013;103:121-128.
https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.004.

35. Gross M.J., Logan B.E. Influence of different chemical treatments on transport of *Alcaligenes paradoxus* in porous media. *Applied and Environmental Microbiology.* 1995;61(5):1750-1756.
https://doi.org/10.1128/aem.61.5.1750-1756.1995.

36. Shen Y., Li P., Chen X., Zou Y., Li H., Yuan G., et al. Activity of sodium lauryl sulfate, rhamnolipids, and N-acetylcysteine against biofilms of five common pathogens. *Microbial Drug Resistance.* 2020;26(3):290-299.
https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0385.

37. Zhong H., Liu G., Jiang Y., Brusseau M.L., Liu Z., Liu Y., et al. Effect of low concentration rhamnolipid on transport of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 in an ideal porous medium with hydrophilic or hydrophobic surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2016;139:244-248.
https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.024.

38. Liu G., Zhong H., Jiang Y., Brusseau M.L., Huang J., Shi L., et al. Effect of low-concentration rhamnolipid biosurfactant on *Pseudomonas aeruginosa* transport in natural porous media. *Water Resources Research.* 2017;53(1):361-375.
https://doi.org/10.1002/2016WR019832.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Саксонов Михаил Наумович,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
msaksonov@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-0094-2447

Жданова Галина Олеговна,
научный сотрудник,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
zhdanova86@ya.ru
https://orcid.org/0000-0002-8355-9517

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Mikhail N. Saksonov,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
msaksonov@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-0094-2447

Galina O. Zhdanova,
Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
zhdanova86@ya.ru
https://orcid.org/0000-0002-8355-9517

Стом Дэвард Иосифович,
д.б.н., профессор,
главный научный сотрудник,
Байкальский музей СО РАН,
664520, п. Листвянка, ул. Академическая, 1,
Российская Федерация;
заведующий лабораторией водной токсикологии,
Иркутский государственный университет, 664003,
г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация;
профессор,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация;
✉stomd@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-9496-2961

Devard I. Stom,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Chief Researcher,
Baikal Museum SB RAS,
1, Academicheskaya St., Listvyanka, 664520,
Russian Federation;
Head of the Laboratory of Water Toxicology, Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation;
Professor,
Irkutsk National Research Technical University, 83,
Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉stomd@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-9496-2961

Алферов Сергей Валерьевич,
к.х.н., заведующий лабораторией экологической и медицинской биотехнологии, НИЦ «БиоХимТех»,
Тульский государственный университет,
300012, г. Тула, ул. Фридриха Энгельса, 157,
Российская Федерация,
s.v.alferov@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-5217-7815

Sergey V. Alferov,
Cand. Sci. (Biotechnology),
Head of the Laboratory,
Laboratory of Ecological and Medical Biotechnology,
RC “BioChemTech”.
Tula State University,
157, Friedrich Engels St., Tula, 300012,
Russian Federation,
s.v.alferov@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-5217-7815

Купчинский Александр Борисович,
к.б.н., директор,
Байкальский музей СО РАН,
664520, п. Листвянка, ул. Академическая, 1,
Российская Федерация,
albor67@mail.ru, bm@isc.irk.ru
http://orcid.org/0000-0001-8884-8636

Alexander B. Kupchinsky,
Cand. Sci. (Biology), Director,
Baikal Museum SB RAS,
1, Academicheskaya St., Listvyanka, 664520,
Russian Federation,
albor67@mail.ru, bm@isc.irk.ru
http://orcid.org/0000-0001-8884-8636

Петрова Юлия Юрьевна,
к.х.н., доцент, директор Института естественных и технических наук,
Сургутский государственный университет,
628412, г. Сургут, ул. Энергетиков, 22,
Российская Федерация,
petrova_juju@surgu.ru, yyp.71@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-3702-2249

Yulia Yu. Petrova,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor, Director of the Institute of Natural and Technical Sciences,
Surgut State University,
22, Energetikov St., Surgut, 628412,
Russian Federation,
petrova_juju@surgu.ru, yyp.71@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-3702-2249

Сасим Сергей Александрович,
к.г.-м.н., доцент, заведующий кафедрой полезных ископаемых, геохимии, минералогии и петрографии,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
sasimserg@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-2712-0075

Sergey A. Sasim,
Cand. Sci. (Geology and Mineralogy),
Associate Professor, Head of the Department of Mineral Resources, Geochemistry, Mineralogy and Petrography,
Irkutsk State University,
1, K. Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
sasimserg@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-2712-0075

Толстой Михаил Юрьевич,
к.т.н., доцент, заведующий кафедрой инженерных коммуникаций и систем жизнеобеспечения, директор инновационного центра «Энергоэффективность», научный руководитель лаборатории качества воды,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
tolstoi@istu.edu
https://orcid.org/0000-0002-1573-060X

Стом Алина Дэвардовна,
к.б.н., доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
apatania@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-7579-4971

Чеснокова Александра Николаевна,
к.х.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
chesnokova@istu.edu
https://orcid.org/0000-0002-0326-7224

Кукшинов Баяр Викторович,
руководитель аналитической лаборатории
ФГБУ «Центр агрохимической службы «Иркутский»,
664510, Иркутская область, р-н Иркутский,
п. Дзержинск, ул. Садовая, 1,
Российская Федерация,
kukshinov1@mail.ru
https://orcid.org/0009-0006-7424-9695

Mikhail Yu. Tolstoy,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor, Head of the Department of Engineering Communications and Life Support Systems, Director of the Energy Efficiency Innovation Center, Scientific Director of the Water Quality Laboratory,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov Sn., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
tolstoi@istu.edu
https://orcid.org/0000-0002-1573-060X

Alina D. Stom,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Irkutsk State University,
1, K. Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
apatania@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-7579-4971

Alexandra N. Chesnokova,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov Sn., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
chesnokova@istu.edu
https://orcid.org/0000-0002-0326-7224

Bayar V. Kukshinov,
Head of Analytical Laboratory
Center for Agrochemical Service “Irkutsk”
1, Sadovaya St., Dzerzhinsk, 664510,
Russian Federation,
kukshinov1@mail.ru
https://orcid.org/0009-0006-7424-9695

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.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

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.

Информация о статье

Поступила в редакцию 02.04.2023.
Одобрена после рецензирования 10.06.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

Information about the article

The article was submitted 02.04.2023.
Approved after reviewing 10.06.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 579.22.582.28:619
EDN: KBHSUY
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-382-391

Анализ состава жирных кислот, летучих полярных и неполярных органических соединений ветеринарного препарата «Траметин Плюс»

В.А. Чхенкели*,✉, Г.Д. Чхенкели*, А.А. Никонова***, А.Г. Горшков***

**ООО «Биотехвет», г. Иркутск, Российская Федерация*
***Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация*
****Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Российская Федерация*

Аннотация. *Для профилактики и лечения ассоциированных желудочно-кишечных и респираторных болезней у молодняка сельскохозяйственных животных предлагается новый ветеринарный препарат «Траметин Плюс», получаемый на основе грибов-ксилотрофов с использованием методов биотехнологии. Свойства биопрепаратов, получаемых на основе микроорганизмов и грибов, зависят от биологически активных веществ, входящих в их состав. В литературе имеются разрозненные сведения об особенностях липогенеза и составе жирных кислот, синтезируемых дереворазрушающими грибами. В работе представлены данные по изучению качественного и количественного состава жирных кислот, качественный анализ летучих полярных и неполярных органических соединений препарата. Установлено, что суммарная концентрация жирных кислот составляет 70 мкг/г препарата. Из них 50,0% приходится на свободные жирные кислоты, из которых доля этерифицированных кислот составляет 50,0% от общей массы жирных кислот. Среди доминирующих неполярных летучих компонентов препарата «Траметин Плюс» можно отметить сквален. Органические алифатические аминокислоты, такие как глицин, аргинин, β-аланин с небольшой молекулярной массой, представлены как минорные неполярные летучие компоненты препарата «Траметин Плюс». Данные анализа подтверждают многокомпонентность препарата, что обусловливает его разнообразные биологические свойства, а именно антибактериальную, противовирусную, антиоксидантную и иммуностимулирующую активность, что вызывает высокую лечебно-профилактическую эффективность ветеринарного препарата «Траметин Плюс».*

Ключевые слова: *ксилотрофы, ветеринарный препарат, жирные кислоты, метиловые эфиры, хромато-масс-спектрометрия*

Финансирование. *Работа выполнена при финансовой поддержке ФБГУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере», договор № 4893ГС1/86520 от 16 февраля 2023 г.*

Для цитирования: Чхенкели В.А., Чхенкели Г.Д., Никонова А.А., Горшков А.Г. Анализ состава жирных кислот, летучих полярных и неполярных органических соединений ветеринарного препарата «Траметин Плюс» // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 382–391. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-382-391. EDN: KBHSUY.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Determining the fatty acids, polar and non-polar volatile organic compounds of the veterinary preparation “Trametin Plus”

Vera A. Chkhenkeli*,✉, Guram D. Chkhenkeli*, Alena A. Nikonova***, Alexander G. Gorshkov***

**Biotechvet LLC, Irkutsk, Russian Federation*
***Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation*
****Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russian Federation*

Abstract. *For the prevention and treatment of associated gastrointestinal and respiratory diseases of growing stock, a new veterinary preparation “Trametin Plus” is proposed. This drug is obtained from fungi-xylotrophs using biotechnology methods. The properties of such preparations depend on bioactive substances included in their composition.*

© Чхенкели В.А., Чхенкели Г.Д., Никонова А.А., Горшков А.Г., 2023

Available publications present miscellaneous information on the lipogenesis features and fatty acids composition synthesized by wood-destroying fungi. In this work, we study the qualitative and quantitative composition of fatty acids and analyze volatile polar and non-polar organic compounds of "Trametin Plus". The total concentration of fatty acids was found to be 70 μg/g, with 50.0% being free acids and 50.0% being their esters. Squalene was established to be the most dominant non-polar volatile component. Concerning the minor non-polar volatile components of "Trametin Plus", these are amino acids with a low molecular weight, such as glycine, arginine and β-alanine. The analysis confirms the multicomponent composition of the preparation, which accounts for its diverse biological properties, namely antibacterial, antiviral, antioxidant and immune-boosting activity. These properties determine the high health-promoting efficacy of the studied veterinary preparation.

Keywords: *xylotrophs, veterinary preparation, fatty acids, methyl esters, chromatography-mass spectrometry*

Funding. *The work was carried out with financial support of the Federal State Budgetary Institution "Fund for Promotion of the Development of Small Forms of Enterprises in the Scientific and Technical Sphere", contract no. 4893GS1/86520 dated February 16, 2023.*

For citation: Chkhenkeli V.A., Chkhenkeli G.D., Nikonova A.A., Gorshkov A.G. Determining the fatty acids, polar and non-polar volatile organic compounds of the veterinary preparation "Trametin Plus". *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(3):382–391. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-382-391. EDN: KBHSUY.

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире возрастает интерес к разработке лекарственных препаратов на основе природных соединений. В медицине становятся приоритетными направления по изучению природных источников лекарственных препаратов [1–10].

Совершенствование системы мер по снижению заболеваемости молодняка сельскохозяйственных животных включает в себя использование новых лечебно-профилактических препаратов, в качестве которого предлагается новый препарат «Траметин Плюс», получаемый на основе культуральной жидкости при жидкофазном культивировании продуцента *Trametes pubescens* (Shumach. Fr.) Pilat., штамм 0663 из коллекции Ботанического института им. Л.Л. Комарова РАН [11–14].

В литературе имеются сведения об особенностях липогенеза и составе липидов низших грибов, водорослей, в то время как для высших грибов, в частности для базидиомицетов, аналогичные данные практически являются разрозненными. Состав свободных жирных кислот (СЖК) базидиомицетов рода малоизучен[1,2,3]. Исследования ограничиваются единичными работами по изучению липидов плодовых тел [15–21]. Однако достаточно хорошо известно, что жирные кислоты обладают фармакологической активностью в отношении различных нозологий как у человека, так и у животных. Целью настоящей работы являлось изучение качественного и количественного состава жирных кислот, качественного состава летучих полярных и неполярных органических соединений ветеринарного препарата «Траметин Плюс».

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Определение жирных кислот проводили по методике Никоновой А.А. и соавторов [22].

Экстракция липидов из препарата «Траметин Плюс». Липиды экстрагировали из параллельных навесок смесью Фолча (хлороформ–метанол в соотношении 2:1, по объему) в пластиковых пробирках типа Эппендорф емкостью 2 мл, встряхивая и выдерживая их в ультразвуковой ванне (1,2 мл × 3 × 5 мин). Экстракты объединяли в стеклянных пробирках для центрифугирования, добавляли 1,2 мл воды, эмульгировали, центрифугировали при 3000 об/мин. Перед экстракцией липидов из губок к навескам (масса влажной навески 0,02 г при влажности 97%) добавляли 100 мкл 8%-й H_2SO_4 в воде и после изменения окраски с зеленой на желтую через 2 мин экстрагировали липиды. Экстракцию липидов из губок проводили один раз, к экстракту добавляли 350 мкл воды.

Кислотная этерификация жирных кислот и получение метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) (общее содержание) препарата «Траметин Плюс». Хлороформный слой экстракта (нижний) переносили в стеклянные пенициллиновые флаконы емкостью 10 мл, упаривали в токе аргона досуха, сразу добавляли 4,5 мл 2%-й H_2SO_4 в метаноле, плотно закрывали фольгой и помещали в термостат при температуре 55 °С на 1,5 ч. После метанолиза жирных кислот растворы охлаждали до комнатной температуры, добавляли 0,8 мл *н*-гексана. МЭЖК из полученных растворов экстрагировали *н*-гексаном (3 мл × 2 × 2 мин). Перед второй экстракцией к растворам добавляли по 1 мл воды. Экстракты концентрировали до 1 мл в токе аргона, осушали безводным Na_2SO_4. Экстракты анализировали методом ГХ-МС.

Раздельное получение метиловых эфиров этерифицированных и свободных жирных кислот в условиях изменения pH препарата «Траметин Плюс». К навескам выделенных липидов (0,2 г сырой массы) добавляли 2 мл 0,4 М раствора NaOH в метаноле, помещали в УЗ-ванну

[1]Цуркан Я.С. Селекция микроорганизмов с высоким содержанием практически значимых полиненасыщенных жирных кислот: дис. … д-ра философии (PhD). Алматы, 2015.195 с.

[2]Поединок Н.И. Биотехнологические основы интенсификации культивирования съедобных и лекарственных макромицетов с помощью света низкой интенсивности: дис. … д-ра биол. наук. Киев, 2015. 387 с.

[3]Горностай Т.Г. Химический состав, способ получения и фармакогностическая характеристика мицелия Inonotus rheades (Hymenochaetaceae): дис. … канд. фарм. наук. Иркутск, 2019. 208 с.

на 5 мин. Полученные метиловые эфиры (МЭ) этерифицированных жирных кислот (ЭЖК) экстрагировали *н*-гексаном (3 мл × 2), промывали водой, сушили безводным Na_2SO_4, концентрировали в токе аргона до объема 1 мл.Экстракты МЭ ЭЖК анализировали методом ГХ. К оставшемуся щелочному раствору добавляли 3 мл воды, 0,15 г перетертого в фарфоровой ступке сульфата меди(II), встряхивали в течение 5–10 мин до перехода голубой окраски Cu_2SO_4 в зеленую – $Cu(OH)_2$ (до pH=6,0), не передерживая раствор, чтобы избежать перехода $Cu(OH)_2$ в CuO черного цвета, способного окислять жирные кислоты. СЖК экстрагировали *н*-гексаном (3 мл × 2). Гексан выпаривали и проводили кислотную этерификацию СЖК. Экстракты анализировали методом ГХ-МС.

Анализ МЭЖК (качественный) методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием экстрактов. Экстракты анализировали на хромато-масс-спектрометре 6890B GC System, 7000C GC/MS Triple Quad (Agilent, США) с колонкой Optima-17 (30 м × 0,25 мм; 0,25 мкм) фирмы Macherey-Nagel (Германия). Температура инжектора составляла 280 °C, температура квадруполя – 150 °C, температура ионного источника – 230 °C; тип ионизации – электронный удар; энергия ионизации 70 эВ; объем пробы 2 мкл в режиме без деления потока; температура блока сопряжения ГХ-МСД 310 °C; поток по колонке 2,54 мл/мин. Хроматографию проводили в условиях нагрева колонки от 80 (удерживание 0,5 мин) до 290 °C со скоростью 2 °C/мин и далее нагрев до 310 °C (удерживание 5 мин) со скоростью 5 °C/мин. Общее время анализа составило 115 мин. Пики детектировали в диапазоне значений *m/z* 40–500. Масс-спектры идентифицировали с использованием программного обеспечения NIST Mass Spectral Search Program for the NIST Mass Spectral Library (V. 2.2).

Количественное определение МЭЖК жирных кислот методом ГХ-МС. Количественное определение МЭЖК проводили методом внутреннего стандарта, для чего к экстрактам перед анализом добавляли 50 мкл стандартного раствора дидецилового эфира ($C_{20}H_{42}O$) в *н*-гексане (1 мг/мл). Детектор градуировали в диапазоне ΣМЭЖК от 40 до 540 мкг в пробе с использованием стандартов (Supelco, США) «35 F.A.M.E. Mix, C4–C24, 100 mg neat» и «Methyl cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic ester, 10 mg/mL in heptane» (70–1000 мкг в пробе). Калибровочные коэффициенты были определены для индивидуальных кислот и для групп кислот (насыщенных, мононенасыщенных, полиненасыщенных).

Экстракция неполярных органических компонентов препарата «Траметин Плюс». Экстракцию неполярных компонентов пробы проводили из навесок препарата «Траметин Плюс» массой 1,0 г. Навеску препарата помещали в стеклянный флакон и экстрагировали 3 мл *н*-гексана трижды (1 мин). Экстракты объединяли, промывали дистиллированной водой, осушали безводным сульфатом натрия, концентрировали в токе аргона до объема 0,5 мл и анализировали методом ГХ-МС в режиме полного сканирования масс-спектра с использованием программного обеспечения «Библиотека масс-спектров» NIST и Mass Spectral Search Program for the NIST Mass Spectral Library (V. 2.2).

Экстракция полярных органических компонентов препарата «Траметин Плюс»

Способ 1. Экстракцию полярных компонентов пробы проводили из навесок препарата «Траметин Плюс» массой 1,0 г. Навеску препарата наносили на патрон с обращенно-фазным сорбентом DSC C-18 (Supelco, США), предварительно промытый *н*-гексаном (5 мл), ацетоном (5 мл), метанолом (5 мл) и дистиллированной водой (10 мл) в вакууме. Элюирование пробы, сконцентрированной на патроне, проводили этанолом (5 мл.) под вакуумом. Экстракт концентрировали в токе аргона до объема 0,5 мл и анализировали методом ГХ-МС в режиме полного сканирования масс-спектра с использованием программного обеспечения «Библиотека масс-спектров» NIST и Mass Spectral Search Program for the NIST Mass Spectral Library (V. 2.2).

Способ 2. Экстракцию полярных компонентов пробы проводили из навесок препарата «Траметин Плюс» массой 1,0 г. К навеске препарата добавляли соляную кислоту HCl до pH=2,0. Экстракцию осуществляли 3 мл хлористого метилена трижды в течение 1 мин. Экстракты объединяли, промывали дистиллированной водой, осушали безводным сульфатом натрия, концентрировали в токе аргона до объема 0,5 мл и анализировали методом ГХ-МС в режиме полного сканирования масс-спектра с использованием программного обеспечения «Библиотека масс-спектров» NIST и Mass Spectral Search Program for the NIST Mass Spectral Library (V. 2.2).

Качественный анализ полярных и неполярных компонентов проб методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Экстракты анализировали на хромато-масс-спектрометре 6890B GC System, 7000C GC/MS Triple Quad (Agilent, США) с колонкой Optima-17 (30 м × 0,25 мм; 0,25 мкм) фирмы Macherey-Nagel (Германия). Температура инжектора составила 280 °C, температура квадруполя – 150 °C, температура ионного источника – 230 °C; тип ионизации – электронный удар; энергия ионизации 70 эВ; объем пробы 2 мкл в режиме с делением потока в соотношении 5:1. Деление 12,691 $см^3$/мин. Температура блока сопряжения ГХ-МСД 310 °C; поток по колонке 3,02 мл/мин. Хроматографию проводили в условиях нагрева колонки от 45 (удерживание 3 мин) до 310 °C (удерживание 15 мин) со скоростью 7 °C/мин. Общее время анализа составило 56 мин. Пики детектировали в диапазоне значений *m/z* 40–500. Масс-спектры идентифицировали с использованием программного обеспечения NIST Mass Spectral Search Program for the NIST Mass Spectral Library (V. 2.2).

В табл. 1 приведены массы проб препарата «Траметин Плюс», указаны экстрагенты, способ подготовки проб, анализируемые компоненты пробы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При проведении анализа СЖК, ЭЖК и общих жирных кислот (ОЖК) ветеринарного препарата «Траметин Плюс» в форме их МЭ среди них проанализированы насыщенные жирные кислоты (НЖК), мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК) и полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК).

На хроматограммах экстрактов МЭ СЖК было выявлено 15 пиков жирных кислот, из которых были идентифицированы все 15 пиков. На хроматограммах экстрактов МЭ ЭЖК было выявлено 18 пиков жирных кислот, из которых были идентифицированы все 18 пиков.

Таблица 1. Данные по анализу проб ветеринарного препарата «Траметин Плюс»

Table 1. Analysis data of samples of the veterinary drug “Trametin Plus”

№ пробы	Препарат, масса, г	Анализируемые компоненты	Экстрагент	Особенности пробоподготовки
1.1	0,996	Общие жирные кислоты	Смесь Фолча для экстракции липидов и н-гексан для экстракции метиловых эфиров жирных кислот	Кислотный гидролиз общих жирных кислот
1.2	1,006			
2.1	1,013	Свободные жирные кислоты		Щелочная этерификация свободных жирных кислот и экстракция метиловых эфиров свободных жирных кислот н-гексаном
2.2	1,024			
3.1	1,013	Этерифицированные жирные кислоты		Переэтерификация этерифицированных жирных кислот при pH = 6 и экстракция метиловых эфиров этерифицированных жирных кислот н-гексаном
3.2	1,024			
4	5,031	Неполярные компоненты	н-гексан	Жидкость-жидкостная экстракция
5	5,025	Полярные компоненты	Этанол	Твердофазная экстракция на патронах с обращенно-фазным сорбентом С18 и элюирование этанолом
6	5,032	Полярные компоненты	Хлористый метилен	Жидкость-жидкостная экстракция при pH = 2,0

Таблица 2. Время удерживания t_R и калибровочные коэффициенты k идентифицированных жирных кислот

Table 2. Retention time t_R and calibration coefficients k of identified fatty acids

Формула жирных кислот	Название IUPAC (и тривиальное название)	t_R, мин	k
12:0	Додекановая кислота (лауриновая)	27,603	1,2149
13:0	Тридекановая кислота (тридециловая)	33,433	1,2416
iso-14:0	Изо-тетрадекановая кислота	36,662	1,3677
a/iso-14:0	Анти-изо-тетрадекановая кислота	36,950	1,3677
14:0	Тетрадекановая кислота (миристиновая)	39,098	1,3677
iso-15:0	Изо-пентадекановая кислота	42,492	1,3842
a/iso-15:0	Анти-изо-пентадекановая кислота	42,975	1,3842
15:0	Пентадекановая кислота (пентадециловая)	44,562	1,3842
16:1	Цис-11-гексадеценовая кислота	48,364	1,2873
16:1	Цис-9-гексадеценовая кислота (пальмитолеиновая)	48,522	1,2873
16:0	Гексадекановая кислота (пальмитиновая)	49,880	1,6130
17:0	Гептадеценовая кислота (маргариновая)	52,928	1,1129
18:2	*Цис, цис*-9, 12-октадекадиеновая кислота (линолевая)	57,902	1,2477
18:1	*Цис*-11-октадеценовая кислота (*цис*-вакценовая)	58,240	1,5533
18:1	*Цис*-9-октадеценовая кислота (олеиновая)	58,535	1,5533
18:0	Октадекановая кислота (стеариновая)	59,686	1,7802
20:0	Эйкозановая кислота (арахиновая)	68,757	1,8832
22:1	*цис*-13-докозеновая кислота (эруковая)	76,026	1,6634

На хроматограммах экстрактов МЭ ОЖК было представлено 18 пиков жирных кислот, из которых были идентифицированы все 18 пиков. Всего в составе проб ветеринарного препарата «Траметин Плюс» идентифицировано 18 жирных кислот, из них 12 НЖК, 5 МНЖК и одна ПНЖК – незаменимая ω-6 полиненасыщенная линолевая кислота, представленная в минимальных количествах. Хроматографические характеристики идентифицированных кислот представлены в табл. 2, качественный и количественный состав – в табл. 3.

На долю этерифицированных кислот, т.е. кислот, которые находятся в препарате в связанной форме в качестве кислотных остатков триглицеридов и фосфолипидов, приходится 45,0% всех жирных кислот препарата. На долю свободных несвязанных жирных кислот приходится 55,0% всех жирных кислот препарата «Траметин Плюс» (табл. 3).

Основная доля всех жирных кислот препарата (82,0%) приходится на НЖК. На долю МНЖК приходится 16,0% всех кислот, на долю ПНЖК – 2,0% (см. табл. 3). Наблюдается перераспределение в составе жирных кислот в зависимости от степени их насыщенности между свободными и связанными кислотами. Так, для свободных кислот на долю насыщенных жирных кислот приходится 67,0%, а на долю ненасыщенных – 33,0%; для связанных кислот на долю НЖК приходится 82,0%, а на долю ненасыщенных – 18,0%. Отмечено преобладание ненасыщенных кислот в свободной неэтерифицированной форме (см. табл. 3).

Из табл. 3 видно, что средняя концентрация жирных кислот в препарате «Траметин Плюс» составляет около 70,0 мкг/г ветпрепарата. Концентрация НЖК составляет около 57,0 мкг/г, концентрация ненасыщенных жирных кислот – около 12,0 мкг/г. Концентрация СЖК составляет около 41,0 мкг/г, концентрация ЭЖК – около 34,0 мкг/г препарата.

Процентное содержание жирных кислот приведено в табл. 4.

Качественный анализ летучих полярных и неполярных органических соединений ветеринарного препарата «Траметин Плюс» был проведен с использованием библиотеки масс-спектров NIST Database. Отмечен очень сложный состав компонентов. В особенности это касается гексанового и этанольного экстрактов препарата. Значительная часть пиков на хроматограммах является негомогенными пиками, которые не могут быть идентифицированы простым сравнением с библиотеками масс-спектров NIST. Значительная часть пиков регистрируется как гомогенные пики, но также не может быть идентифицирована путем сравнения масс-спектров этих пиков с библиотечными, поскольку масс-спектры пиков препарата «Траметин Плюс» и библиотечных спектров имеют значимые различия.

Вероятнее всего, это связано со сложностью объекта и уникальностью биологических соединений,

Таблица 3. Качественный и количественный (мкг/г) состав жирных кислот препарата «Траметин Плюс»

Table 3. Qualitative and quantitative (mcg/g) composition of fatty acids of “Trametin Plus”

Формула жирных кислот	Содержание жирных кислот в препарате, мкг/г препарата									
	Номера проб						Среднее содержание			
	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	ОЖК*	ЭЖК	СЖК	ОЖК**
12:0	0,099	0,098	0,091	0,127	0,031	0,709	0,099	0,109	0,370	0,478
13:0	0,122	0,121	0,000	0,000	0,045	0,145	0,121	0,000	0,095	0,095
iso-14:0	0,444	0,439	0,226	0,237	0,280	0,696	0,441	0,232	0,488	0,720
a/iso-14:0	0,234	0,232	0,299	0,274	0,067	0,146	0,233	0,287	0,106	0,393
14:0	3,317	3,284	1,107	1,031	0,890	3,325	3,301	1,069	2,108	3,177
iso-15:0	3,835	3,797	6,659	5,886	0,132	0,451	3,816	6,272	0,291	6,564
a/iso-15:0	6,221	6,159	10,26	9,481	0,252	0,984	6,190	9,871	0,618	10,49
15:0	1,642	1,626	0,290	0,320	0,363	1,238	1,634	0,305	0,800	1,106
16:1	2,951	2,921	0,852	0,810	1,601	3,397	2,936	0,831	2,499	3,330
16:1	1,090	1,079	1,629	1,287	0,426	0,621	1,085	1,458	0,524	1,982
16:0	28,57	28,29	8,270	7,760	7,33	23,57	28,428	8,016	15,45	23,46
17:0	1,077	1,066	1,365	1,061	0,193	0,164	1,071	1,213	0,179	1,392
18:2	1,161	1,150	0,555	0,505	0,932	1,771	1,156	0,530	1,352	1,881
18:1	6,047	5,987	2,038	1,878	4,801	10,37	6,017	1,958	7,586	9,544
18:1	0,550	0,544	0,318	0,289	0,367	0,830	0,547	0,304	0,598	0,902
18:0	10,71	10,60	1,691	1,580	3,330	9,605	10,65	1,636	6,468	8,103
20:0	0,735	0,727	0,000	0,000	0,177	0,413	0,731	0,000	0,295	0,295
22:1	0,589	0,583	0,000	0,000	0,834	1,288	0,586	0,000	1,061	1,061
Сумма	69,39	68,70	35,65	32,53	22,05	59,72	69,05	34,09	40,88	74,97
НЖК	57,00	56,44	30,26	27,76	13,09	41,44	56,72	29,01	27,26	56,27
МНЖК	11,23	11,11	4,838	4,265	8,030	16,51	11,17	4,551	12,27	16,82
ПНЖК	1,161	1,150	0,555	0,505	0,932	1,771	1,156	0,530	1,352	1,881

Примечание. Здесь и в табл. 4: *– общее содержание жирных кислот (свободных и этерифицированных), полученное прямым способом (см. п. 2); **– общее содержание жирных кислот (свободных и этерифицированных), полученное суммированием значений содержаний свободных и этерифицированных жирных кислот в пробах, полученных согласно п. 3.

Таблица 4. Качественный и количественный (% от суммы) состав жирных кислот препарата «Траметин Плюс»

Table 4. Qualitative and quantitative (% of the total) composition of the fatty acids of "Trametin Plus"

Формула жирных кислот	Состав жирных кислот в препарате, % от суммы жирных кислот в пробе									
	Номера проб						Среднее содержание			
	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2	ОЖК*	ЭЖК	СЖК	ОЖК**
12:0	0,14	0,14	0,25	0,39	0,14	1,19	0,14	0,32	0,90	0,64
13:0	0,18	0,18	0,00	0,00	0,20	0,24	0,18	0,00	0,23	0,13
iso-14:0	0,64	0,64	0,63	0,73	1,27	1,17	0,64	0,68	1,19	0,96
a/iso-14:0	0,34	0,34	0,84	0,84	0,30	0,24	0,34	0,84	0,26	0,52
14:0	4,78	4,78	3,11	3,17	4,04	5,57	4,78	3,14	5,15	4,24
iso-15:0	5,53	5,53	18,7	18,1	0,60	0,76	5,53	18,40	0,71	8,75
a/iso-15:0	8,96	8,96	28,8	29,2	1,14	1,65	8,96	29,0	1,51	14,0
15:0	2,37	2,37	0,81	0,98	1,65	2,07	2,37	0,90	1,96	1,47
16:1	4,25	4,25	2,39	2,49	7,26	5,69	4,25	2,44	6,11	4,44
16:1	1,57	1,57	4,57	3,96	1,93	1,04	1,57	4,28	1,28	2,64
16:0	41,2	41,2	23,2	23,9	33,2	39,5	41,2	23,5	37,8	31,3
17:0	1,55	1,55	3,83	3,26	0,88	0,27	1,55	3,56	0,44	1,86
18:2	1,67	1,67	1,56	1,55	4,23	2,97	1,67	1,55	3,31	2,51
18:1	8,71	8,71	5,72	5,77	21,8	17,4	8,71	5,74	18,6	12,7
18:1	0,79	0,79	0,89	0,89	1,67	1,39	0,79	0,89	1,46	1,20
18:0	15,4	15,4	4,74	4,86	15,1	16,1	15,4	4,80	15,8	10,8
20:0	1,06	1,06	0,00	0,00	0,80	0,69	1,06	0,00	0,72	0,39
22:1	0,85	0,85	0,00	0,00	3,78	2,16	0,85	0,00	2,60	1,42
Сумма	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
НЖК	82,2	82,2	84,9	85,3	59,4	69,4	82,2	85,1	66,7	75,1
МНЖК	16,2	16,2	13,6	13,1	36,4	27,6	16,2	13,4	30,0	22,4
ПНЖК	1,67	1,67	1,56	1,55	4,23	2,97	1,67	1,55	3,31	2,51

входящих в его состав, часть из которых может быть пока просто неизвестна науке. Подробная идентификация компонентов препарата требует серьезных длительных научных исследований, тщательной и детализированной для каждого класса соединений подготовки проб, изучения структуры соединений с использованием различных методов хроматографии, масс-спектрометрии, ядерного магнитного резонанса и т.д. Ряд пиков летучих компонентов на хроматограммах указанных экстрактов может быть идентифицирован с вероятностью ≥70,0%. Эти соединения представлены ниже (табл. 5, 6).

Неполярные летучие компоненты пробы, растворимые в *н*-гексане, представлены соединениями с небольшими молекулярными массами $Mr \leq 350$ (см. табл. 5), среди них пираны, фураны, спирты, альдегиды, кетоны, гетероциклические соединения, насыщенные алифатические углеводороды (предельные *n*-алканы), непредельные углеводороды диенового ряда, в том числе сквален, ароматические соединения, индол (см. табл. 5).

Полярные летучие компоненты пробы, растворимые в этиловом спирте, представлены соединениями с небольшими молекулярными массами $Mr \leq 310$ (см. табл. 6), среди них уксусная кислота, ацетоин – один из продуктов бутандиолового брожения, уксусный ангидрид, фурфураль – продукт дегидрирования ксилозы (см. табл. 6), гетероциклические соединения фуранон и пиранон, альдегиды, в том числе фенилацетальдегид, пептиды, кетоны, простейшие сахара и аминокислоты, ароматические соединения.

Летучие аминокислоты препарата «Траметин Плюс» представлены как минорные компоненты пробы, среди них глицин и саркозин в форме дипептида глицилсаркозина, где саркозин – метильное производное аминокислоты глицина, аргинин и *β*-аланин, представленный в форме амида аминокислоты *β*-аланин и пантоевой кислоты (витамин группы В).

Среди перечисленных соединений есть соединения, обладающие несомненной и достаточно сильной биологической активностью. Активность проявляется как противовоспалительное, антибактериальное, противовирусное, антиоксидантное, обволакивающее, иммуномодулирующее, противоопухолевое действие. При этом ряд соединений обладает несомненной токсичностью в экспериментах на животных согласно литературным данным, включая гепатотоксичность, канцерогенность, общетоксическое действие, нейротоксичность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен количественный анализ жирных кислот ветеринарного препарата «Траметин Плюс». Показано, что суммарная концентрация жирных кислот составляет 70 мкг/г препарата. Из них 50,0% приходится на СЖК, большинство из которых обладают мощным антибактериальным, противовирусным, противоопухолевым действием, в то время как этерифицированные (связанные) кислоты, на долю которых приходится 50,0% от общей массы жирных кислот, в большей степени обладают обволакивающим и противовоспалительным действием. В то же время незаменимые ПНЖК в препарате практически отсутствуют. Согласно литературе

Таблица 5. Неполярные органические компоненты препарата «Траметин Плюс» согласно библиотеке NIST

Table 5. Non-polar organic components of the drug "Trametin Plus" according to the NIST library

t_R, мин	Формула	Название согласно библиотеке масс-спектров NIST
2,089	$C_6H_{12}O$	2,5-диметилтетрагидрофуран
2,204	$C_6H_{12}O$	2-метилтетрагидро-2Н-пиран
2,239	C_7H_{14}	метилциклогексан
2,647	$C_6H_{14}O$	3-метил-3-пентанол,
2,941	C_7H_8	толуол
3,336	$C_6H_{12}O$	3-метил-1-пентин-3-ол
3,409	$C_6H_{14}O$	2-гексанол
3,723	$C_6H_{12}O$	3-гексанон
5,427	$C_7H_{16}O_2$	5-метокси-2-метил-2-пентанол
5,507	$C_6H_{14}S$	1- гексантиол
5,950	$C_9H_{18}O_3$	2-этоксиэтил-3-метилбутаноат
6,443	$C_6H_{10}O_2$	1-(3-этилоксиранил)этанон
7,654	$C_{17}H_{30}O_4$	циклогексилнонилоксалат
9,123	$C_{13}H_{26}$	гептилциклогексан
10,239	C_8H_8O	фенилацетальдегид
12,882	$C_{11}H_{16}O$	1-метокси-4-метил-2-(1-метилэтил) бензол
14,478	C_7H_5NS	1,2-бензизотиазол
15,691	$C_{10}H_{12}O$	анетол
15,776	C_8H_7N	индол
17,211	$C_{14}H_{30}$	тетрадекан
21,004	$C_{16}H_{34}$	гексадекан
21,477	$C_{12}H_{14}O$	4-метил-1-фенил-1-пентен-3-он
22,957	$C_{13}H_{16}O$	5-метил-1-фенил-1-гексен-3-он
25,027	$C_{17}H_{34}O_2$	изопропил-12-метилтридеканоат
25.600	$C_{18}H_{38}O$	1-октадеканол
26,382	$C_{16}H_{22}O_4$	диизобутилфталат
27,515	$C_{17}H_{36}$	2,6,10-триметилтетрадекан
27,929	$C_{16}H_{22}O_4$	дибутилфталат
28,711	$C_{20}H_{40}$	1-эйкозен
31,553	$C_{22}H_{46}O$	1-докозанол
35,434	$C_{24}H_{38}O_4$	диизоктилфталат
37,738	$C_{30}H_{50}$	сквален
38,435	$C_{22}H_{43}NO$	*транс*-13-докозенамид

Таблица 6. Полярные органические компоненты препарата «Траметин Плюс» согласно библиотеке NIST

Table 6. Polar organic components of the drug "Trametin Plus" according to the NIST library

t_R, мин	Формула	Название согласно библиотеке масс-спектров NIST
2,586	$C_2H_4O_2$	уксусная кислота
3,485	$C_4H_8O_2$	ацетоин
4,09	$C_4H_{10}O_2$	2,3-бутандиол, [S-(R*,R*)]-
4,489	$C_4H_6O_3$	уксусный ангидрид
5,156	$C_5H_4O_2$	фурфурол
8,046	$C_4H_4O_2$	2(5Н)-Фуранон
8,616	$C_6H_6O_2$	5-метилфурфурол
10,255	C_8H_8O	фенилацетальдегид
10,932	$C_5H_{10}N_2O_3$	глицилсаркозин
11,711	$C_6H_8O_4$	пиранон
12,161	$C_{12}H_{14}N_4O_4$	2-винил-9-[3-дезокси-β-d-рибофуранозил]гипоксантин
12,97	$C_{25}H_{44}N_2O_5S$	2-миристиноилпантетеин
13,712	$C_6H_{14}N_4O_2$	аргинин
14,534	$C_6H_6O_3$	5-гидроксиметилфурфурол
14,863	$C_8H_{14}O_7$	6-O-acetyl-β-d-маннопираноза
15,785	C_8H_7N	м-аминофенилацетилен
20,963	$C_{19}H_{15}N_3O$	имидазоло[1,2-a] пиридин-6-карбонитрил, 1,2,3,5-тетрагидро-7-метил
24,782	$C_5H_4N_4O_3$	мочевая кислота
28,693	$C_{14}H_{22}N_2O_2$	5,10-диэтокси-2,3,7,8-тетрагидро-1Н,6Н-дипирроло[1,2-a:1',2'-d] пиразин
31,316	$C_{12}H_{14}N_2O_2$	3-метил-6-(фенилметил)-2,5-пиперазиндион
31,714	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	3-(фенилметил)-2,5-пиперазиндион
33,951	$C_{15}H_{20}N_2O_2$	цикло-(L-лейцил-L-фенилаланил)
34,714	$C_{14}H_{16}N_2O_2$	пирроло[1,2-a] пиразин-1,4-дион, гексагидро-3-(фенилметил)-

высокое содержание СЖК может быть характерно для ряда водорослей [15], мицеллярных грибов [16] и, как показано в наших исследованиях, для базидиальных грибов. Их анализ, бесспорно, играет важную роль в диагностической медицине [17].

Среди доминирующих неполярных летучих компонентов препарата «Траметин Плюс» присутствует соединение тритерпенового ряда – сквален $C_{30}H_{50}$ (надежность определения методом ГХ-МС ≥95,0%). Это вещество обладает мощным антиоксидантным, иммуностимулирующим, обволакивающим поверхностно-активным действием, защищая слизистые оболочки организма.

Простейшие органические алифатические аминокислоты, такие как глицин (*M* = 75 г/моль), аргинин (*M* = 174 г/моль), *β*-аланин (*M* = 89 г/моль), с небольшой молекулярной массой представлены как минорные неполярные летучие компоненты препарата «Траметин Плюс».

Остальные органические компоненты препарата способны оказывать комплексное воздействие на организм. Токсичность некоторых компонентов для животных может быть рассмотрена для установления доз и сроков применения препарата «Траметин Плюс».

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ильичёва Т.Н., Ананко Г.Г., Косогова Т.А., Олькин С.Е., Омигов В.В., Таранов О.С. [и др.]. Проти-вовирусная активность меланина из чаги (*Inonotus obliquus*), полученного на основе культивирования штамма F-1244, выделенного в чистую культуру // Химия растительного сырья. 2020. N 2. С. 283–289. https://doi.org/10.14258/jcpim.2020025167.

2. Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Косогова Т.А., Кабанов А.С., Петровская И.Ф. Трутовик скошенный, чага *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilat. – перспективный гриб для получения противовирусных препаратов // Микология сегодня. М.: Национальная академия микологии, 2022. Т. 4. С. 107–119.

3. Teplyakova T.V., Gashnikova N. Medical mushrooms in complex treatment of human Immunodeficiency virus infection // International Journal of Medicine Mushrooms. 2019. Vol. 21, no. 5. P. 487–492. https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2019030175.

4. Голышкин А.В., Альмяшева Н.Р., Зиангирова М.Ю., Краснопольская Л.М. Ростовые и биохимические харак-теристики некоторых видов съедобных и лекарственных грибов в зависимости от способов предобработки лигноцеллюлозного сырья // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. N 3. С. 607–615. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.3.607rus .

5. Тренин А.С., Краснопольская Л.М., Бычкова О.П., Альмяшева Н.Р., Голышкин А.В., Максимова М.А. [и др.]. Скрининг ингибиторов биосинтеза стеролов для создания новых антифунгальных антибиотиков // Успехи медицинской микологии. 2019. Т. 20. С. 465–469. EDN: QXHXSX.

6. Golyshkin A., Almyasheva N., Yarina M., Krasnopolskaya L. Mycelium growth of xylotrophic basidiomycetes on chemically modified lignocellulosic substrates // Abstract Book, XVIII Congress of European Mycologists (Warsaw and Białowieża, 16–21 September 2019). Warsaw, 2019. P. 98.

7. Almyasheva N., Golyshkin A., Rogozhin E., Krasnopolskaya L. The comparative study of phenolic metabolites produced by *Hericium erinaceus* and *Agrocybe aegerita* in vegetative and generative stages // Abstract Book, XVIII Congress of European Mycologists (Warsaw and Białowieża, 16–21 September 2019). Warsaw, 2019. P. 99.

8. Тренин А.С., Краснопольская Л.М., Бычкова О.П., Максимова М.А., Альмяшева Н.Р., Голышкин А.В. Биологически активные соединения высших грибов с антифугальной активностью и способностью к подавлению биосинтеза стеролов // Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии: 5-я Международная междисциплинарная конференция (г. Судак, 15–18 сентября 2019 г.). М.: Перо, 2019. С. 172. EDN: QNTAIH.

9. Альмяшева Н.Р., Голышкин А.В., Зиангирова М.Ю., Петрова Д.А., Краснопольская Л.М. Продукция липо-литических ферментов ксилотрофными грибами отдела Basidiomycota // Антибиотики и химиотерапия. 2018. Т. 63. N 1-2. С. 8–13. EDN: XTGEMH.

10. Almyasheva N.R., Shuktueva M.I., Petrova D.A., Kopytsyn D.S., Kotolev M.S., Vinokurov V.A., et al. Biodisel fuel production by *Aspergillus niger* whole-cell biocatalyst in optimized medium // Mycoscience. 2017. Vol. 59, no. 2. P. 147–152. https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.09.003.

11. Чхенкели В.А., Романова Е.Д., Власов Б.Я. Профилактика негативного воздействия экологи-ческих факторов на организм молодняка сельско-хозяйственных животных и птицы с использованием ветеринарного препарата Траметин. Lambert Academic Publshing, 2020. 121 с.

12. Чхенкели В.А. Механизмы действия препарата Траметин на организм животных при ассоциированных инфекциях. СПб.: Проспект науки, 2020.176 с.

13. Чхенкели В.А. Препараты последнего поколения на основе грибов-ксилотрофов рода Trametes: обнаруженные эффекты, механизмы действия и применение. М.: Перо, 2014. 126 с. EDN: SXVVQZ.

14. Чхенкели В.А., Уланская А.В. Сальмонеллез как биологический фактор в экотехсистеме и его профилактика с использованием ветеринарного препарата «Траметин». Иркутск: Изд-во ИГУ, 2022. 107 с.

15. Falk-Petersen S., Sargent J.R., Henderson J., Hegseth E.N., Hop H., Okolodkov Y.B. Lipids and fatty acids in ice algae and phytoplankton from the marginal ice zone in the Barents sea // Polar Biology. 1998. Vol. 20. P. 41–47. https://doi.org/10.1007/s003000050274.

16. Феофилова Е.П., Бурлакова Е.Б., Кузнецова Л.С. Значение реакции свободного окисления в регуляции роста и липидообразования эукариотных и прокариотных организмов // Прикладная биохимия и микробиология. 1987. Т. 23. N 1. С. 3–13.

17. Феофилова Е.П., Горнова И.Б., Меморская А.С., Гарибова Л.В. Липидный состав плодовых тел и глубинного мицелия Lentinus edodes (Berk.) Sing [Lentinula edodes (Berk.) Pegler)] // Микробиология. 1998. Т. 67. N 5. С. 655–659.

18. Белова Н.В. Перспективы использования биологически активных соединений базидиальных грибов в России // Микология и фитопатология. 2004. Т. 38. N 2. С. 1–7.

19. Бабицкая В.Г., Черноок Т.В., Щерба В.В. Характеристика липидов глубинного мицелия грибов // Вестник Белорусского государственного университета. Серия 2: Химия. Биология. География. 2009. Т. 4. N 1. С. 101–111.

20. Лощинина Е.А., Цивилева О.М., Макаров О.Е., Никитина В.Е. Изменение углеводного и жирнокислотного состава мицелия *Lentinus edodes* при совместном культивировании *Azoprifilum brasilense* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2012. N 2. С. 64–67.

21. Цивилёва О.М., Нгуен Т.Ф., Ву Л.Н., Чернышова М.П., Юрасов Н.А., Петров А.Н. [и др.] Липидные компоненты пигментированного и глубинного мицелия *Ganoderma* разных климатических зон // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2015. N 3. С. 37–47.

22. Никонова А.А., Шишлянников С.М., Шишлянникова Т.А., Авезова Т.Н., Бабенко Т.А., Белых О.И. [и др.] Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в гидробионтах с различным содержанием полиненасыщенных кислот методом газожидкостной хроматографии // Журнал аналитической химии. 2020. Т. 75. N 10. С. 907–920. https://doi.org/10.31857/S0044450220100102. EDN: WHRREK.

REFERENCES

1. Ilyicheva T.N., Anan'ko G.G., Kosogova T.A., Olkin S.E., Omigov V.V., Taranov O.S., et al. Antiviral activity of the melanin from birch fungus (*Inonotus obliquus*) obtained by cultivating F-1244 strain isolating to pure culture. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya.* 2020;(2):283-289. (In Russian).
https://doi.org/10.14258/jcpim.2020025167.

2. Teplyakova T.V., P'yankov O.V., Kosogova T.A., Kabanov A.S., Petrovskaya I.F. Mowed polypore, chaga *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilat. – a promising mushroom for obtaining antiviral drugs. In: *Mycology today.* Moscow: Natsional'naya akademiya mikologii; 2022, vol. 4, p. 107-119. (In Russian).

3. Teplyakova T.V., Gashnikova N. Medical mushrooms in complex treatment of human Immunodeficiency virus infection. *International Journal of Medicine Mushrooms.* 2019;21(5):487-492.
https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2019030175.

4. Golyshkin A.V., Almyasheva N.R., Ziangirova M. Yu., Krasnopolskaya L.M. Effect of pretreatment of lignocellulosic substrates on physiological and biochemical characteristics of some species of edible and medical mushrooms. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology.* 2019;54(3):607-615. (In Russian).
https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.3.607rus.

5. Trenin A.S., Krasnopol'skaya L.M., Bychkova O.P., Al'myasheva N.R., Golyshkin A.V., Maksimova M.A., et al. Screening of inhibitors of sterol biosynthesis for the development of new antifungal antibiotics. *Uspekhi meditsinskoi mikologii.* 2019;20:465-469. (In Russian). EDN: QXHXSX.

6. Golyshkin A., Almyasheva N., Yarina M., Krasnopolskaya L. Mycelium growth of xylotrophic basidiomycetes on chemically modified lignocellulosic substrates. In: *Abstract Book, XVIII Congress of European Mycologists*. Warsaw and Białowieża, 16–21 September 2019. Warsaw; 2019, p. 98.

7. Almyasheva N., Golyshkin A., Rogozhin E., Krasnopolskaya L. The comparative study of phenolic metabolites produced by *Hericium erinaceus* and *Agrocybe aegerita* in vegetative and generative stages. In: *Abstract Book, XVIII Congress of European Mycologists*. Warsaw and Białowieża, 16–21 September 2019. Warsaw; 2019, p. 99.

8. Trenin A.S., Krasnopol'skaya L.M., Bychkova O.P., Maksimova M.A., Al'myasheva N.R., Golyshkin A.V. Biologically active compounds of higher fungi with antifugal activity and the expectation of a decrease in sterol biosynthesis. In: *Molekulyarnye i biologicheskie aspekty khimii, farmatsevtiki i farmakologii: 5-ya Mezhdunarodnaya mezhdistsiplinarnaya konferentsiya = Molecular and Biological Aspects of Chemistry, Pharmaceutics and Pharmacology: 5th International Interdisciplinary Conference.* Sudak, 15–18 September 2019. Moscow: Pero; 2019, p. 172. (In Russian). EDN: QNTAIH.

9. Almyasheva N.R., Golyshkin A.V., Ziangirova M.Y., Petrova D.A., Krasnopolskaya L.M. Production of lipolytic enzymes by xylotrophic fungi of the division Basidiomycota. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy.* 2018;63(1-2):8-13. (In Russian). EDN: XTGEMH.

10. Almyasheva N.R., Shuktueva M.I., Petrova D.A., Kopytsyn D.S., Kotolev M.S., Vinokurov V.A., et al. Biodisel fuel production by *Aspergillus niger* wholecell biocatalyst in optimized medium. *Mycoscience.* 2017;59(2):147-152.
https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.09.003.

11. Chkhenkeli V.A., Romanova E.D., Vlasov B.Ya. *Prevention of the negative impact of environmental factors on the body of young farm animals and poultry using the veterinary drug Trametin.* Lambert Academic Publshing; 2020. 121 p. (In Russian).

12. Chkhenkeli V.A. *Mechanisms of action of trametin preparations on the body of animals with concomitant infections.* St. Petersburg: Prospekt nauki; 2020.176 p. (In Russian).

13. Chkhenkeli V.A. *Main generations based on xylotrophic fungi of the genus Trametes: revealed effects, mechanisms of action and application*. Moscow: Pero; 2014. 126 p. EDN: SXVVQZ. (In Russian).

14. Chkhenkeli V.A., Ulanskaya A.V. *Salmonellosis as a biological factor in the eco-technical system and its prevention using the veterinary drug "Trametin"*. Irkutsk: Izd-vo IGU; 2022. 107 p. (In Russian).

15. Falk-Petersen S., Sargent J.R., Henderson J., Hegseth E.N., Hop H., Okolodkov Y.B. Lipids and fatty acids in ice algae and phytoplankton from the marginal ice zone in the Barents sea. *Polar Biology.* 1998;20:41-47.
https://doi.org/10.1007/s003000050274.

16. Feofilova E.P., Burlakova E.B., Kuznetsova L.S. The significance of the free oxidation reaction in the regulation of growth and lipid formation of eukaryotic and prokaryotic organisms. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 1987;23(1):3-13. (In Russian).

17. Feofilova E.P., Gornova I.B., Memorskaya A.S., Garibova L.V. Lipid composition of fruit bodies and deep mycelium of Lentinus edodes (Berk.) Sing [Lentinula edodes (Berk.) Pegler)]. *Mikrobiologiya.* 1998;67(5):655-659. (In Russian).

18. Belova N.V. Prospects for the use of biologically active compounds of basidiomycetes in Russia. *Mikologiya i fitopatologiya.* 2004;38(2):1-7. (In Russian).

19. Babitskaya V.G., Chernook T.V., Shcherba V.V. Characterization of lipids in the deep mycelium of fungi. *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 2: Khimiya. Biologiya. Geografiya.* 2009;4(1): 101-111. (In Russian).

20. Loschinina E.A., Tsivileva O.M., Makarov O.E., Nikitina V.E. Changes in carbohydrate and fatty-acid content of *Lentinus edodes* mycelium in dual cultures with *Azospirillum brasilense*. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2012;2:64-67. (In Russian).

21. **T**sivileva O.M., Nguyen T.P., Vu L.N., Chernyshova M.P., Yurasov N.A., Petrov A.N., et al. Lipidic components of pigmented and submerged mycelium of *Ganoderma* from different climatic zones. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2015;(3):37-47. (In Russian).

22. Nikonova A.A., Shishlyannikov S.M., Shishlyannikova T.A., Avezova T.N., Babenko T.A., Belykh O.I., et al. Determination of free and esterified fatty acids in hydro-

coles of different content of polyunsaturated fatty acids by gas–liquid chromatography. *Zhurnal analiticheskoi khimii.* 2020;75(10):907-920. (In Russian).

https://doi.org/10.31857/S0044450220100102. EDN: WHRREK.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Чхенкели Вера Александровна,
д.б.н., доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 2,
Российская Федерация;
генеральный директор,
ООО «Биотехвет»,
664007, г. Иркутск, ул. Декабрьских событий,
105А/12, Российская Федерация,
✉chkhenkeli@rambler.ru
https://orcid.org/0000-0001-8175-2623

Чхенкели Гурам Давидович,
к.т.н., старший научный сотрудник,
ООО «Биотехвет»,
664007, г. Иркутск, ул. Декабрьских событий,
105А/12, Российская Федерация,
chkhenkeli@rambler.ru

Никонова Алена Александровна,
к.х.н., старший научный сотрудник,
Лимнологический институт СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, Российская Федерация,
alenaxis@list.ru

Горшков Александр Георгиевич,
к.х.н., заведующий лабораторией,
Лимнологический институт СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3, Российская Федерация,
gorchkov_ag@mail.ru

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 04.05.2023.
Одобрена после рецензирования 29.06.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Vera A. Chkhenkeli,
Dr. Sci. (Biology), Associate Professor,
Irkutsk State University,
2, Lenin St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation;
General Director,
Biotechvet LLC,
105A/12, Dekabr'skikh Sobytii St., Irkutsk, 664007,
Russian Federation,
✉chkhenkeli@rambler.ru
https://orcid.org/0000-0001-8175-2623

Guram D. Chkhenkeli,
Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher,
Biotechvet LLC,
105A/12, Dekabr'skikh Sobytii St., Irkutsk, 664007,
Russian Federation,
chkhenkeli@rambler.ru

Alena A. Nikonova,
Cand. Sci (Chemistry), Senior Researcher,
Limnological Institute SB RAS,
3, Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
alenaxis@list.ru

Alexander G. Gorshkov,
Cand. Sci (Chemistry), Head of the Laboratory,
Limnological Institute SB RAS,
3, Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
gorchkov_ag@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

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

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

Information about the article

The article was submitted 04.05.2023.
Approved after reviewing 29.06.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 662.231.39
EDN: KXAXSG
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-392-401

Синтез нитратов целлюлозы из целлюлозы мискантуса гигантского сорта Камис, полученной в условиях опытно-промышленного производства

А.А. Корчагина

Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, г. Бийск, Российская Федерация

Аннотация. *Работа посвящена исследованию нового национального сырьевого ресурса – мискантуса гигантского сорта Камис, позиционируемого в качестве наиболее перспективного природного источника получения высококачественной целлюлозы с целью ее дальнейшей химической функционализации. В условиях опытно-промышленного производства из исходного сырья с содержанием целлюлозы 50,2% азотнокислым способом выделена опытная партия технической целлюлозы, характеризующаяся высокими значениями массовой доли α-целлюлозы – 92,8% и степени полимеризации – 1200. На основе опытной партии технической целлюлозы получен образец нитратов целлюлозы с основными функциональными свойствами: массовой долей азота 11,18%, вязкостью 48 мПа·с и растворимостью 94%. Синтезированный образец характеризуется предельно высокой растворимостью в ацетоне, что подтверждает получение именно азотнокислых эфиров целлюлозы, и высоким выходом – 150%. Методом ИК-Фурье спектроскопии идентифицированы основные функциональные группы в опытной партии технической целлюлозы (3384, 2902, 1639, 1428, 1370, 1319, 1161, 700–500 см$^{-1}$) и в образце нитратов целлюлозы (1659, 1278, 834, 746, 683 см$^{-1}$), установлена соответствующая принадлежность к целлюлозе и азотнокислым эфирам целлюлозы. Методом растровой электронной микроскопии охарактеризованы структурно-морфологические особенности волокон опытной партии технической целлюлозы и образца нитратов целлюлозы. Методами совмещенного термогравиметрического и дифференциально-термического анализов установлены высокие значения температуры начала интенсивного разложения – 197 °С и удельной теплоты разложения – 6,92 кДж/г. Полученные результаты обосновывают способность целлюлозы, выделенной из нового альтернативного источника, к химической функционализации в азотнокислые эфиры целлюлозы с удовлетворительными функциональными свойствами.*

Ключевые слова: *мискантус гигантский, азотнокислый способ, опытно-промышленное производство, техническая целлюлоза, нитрование, нитраты целлюлозы*

Благодарности. *Автор выражает благодарность директору ООО «Мастер БРЭНД» Воинскому С.М. за выращивание и поставку образцов мискантуса гигантского сорта Камис.*

Финансирование. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, https://rscf.ru/project/22-13-00107/ .*

Для цитирования: Корчагина А.А. Синтез нитратов целлюлозы из целлюлозы мискантуса гигантского сорта Камис, полученной в условиях опытно-промышленного производства // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 392–401. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-392-401. EDN: KXAXSG.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Synthesis of cellulose nitrates from *Miscanthus* × *giganteus* var. KAMIS cellulose obtained under pilot production conditions

Anna A. Korchagina

Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies SB RAS, Biysk, Russian Federation

Abstract. *The work is devoted to the study of a novel national raw material resource Miscanthus × Giganteus var. KAMIS, which is positioned as one of the most promising natural sources for obtaining high-quality cellulose for the purpose of its further chemical functionalisation. A batch of technical cellulose isolated from raw materials under pilot production conditions using the nitric acid method having a cellulose content of 50.2% was characterized by*

© Корчагина А.А., 2023

high α-cellulose mass fraction (92.8%) and degree of polymerisation (1200) values. On the basis of the pilot batch of technical cellulose, a sample of cellulose nitrates offering basic functional properties was obtained: mass fraction of nitrogen – 11.18%; viscosity – 48 MPa·s; solubility – 94%. The synthesised sample is characterized by extremely high solubility in acetone, confirming the production of cellulose nitric acid esters, and a high yield of 150%. IR-Fourier spectroscopy was used to identify the main functional groups in the experimental batch of technical cellulose (3384, 2902, 1639, 1428, 1370, 1319, 1161, 700–500 cm^{-1}) and in a sample of cellulose nitrates (1659, 1278, 834, 746, 683 cm^{-1}). Acorresponding affiliation to cellulose and cellulose nitric acid esters was established. The structural and morphological features of the fibres of the experimental batch of technical cellulose and a sample of cellulose nitrates were characterised using scanning electron microscopy. Combined methods of thermogravimetric and differential thermal analyses were used to establish high initial temperature (197 °C) and specific heat of decomposition (6.92 kJ/g) values at the beginning of intensive decomposition. The obtained results substantiate the possibility to chemically functionalise cellulose isolated from a new alternative source into cellulose nitric acid esters with satisfactory functional properties.

Keywords: *Miscanthus × Giganteus var. KAMIS, nitric acid method, pilot production, technical cellulose, nitration, cellulose nitrates*

Acknowledgements. *The author expresses gratitude to the director of OOO "Master BRAND" Voinsky S.M. for the cultivation and supply of samples of biomass of miscanthus giant variety KAMIS.*

Funding. *The research was carried out at the expense of the grant of the Russian Science Foundation no. 22-13-00107,* https://rscf.ru/project/22-13-00107/.

For citation: Korchagina A.A. Synthesis of cellulose nitrates from *Miscanthus × giganteus* var. KAMIS cellulose obtained under pilot production conditions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(3):392–401. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-392-401. EDN: KXAXSG.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время нитраты целлюлозы (НЦ), являющиеся одними из наиболее эффективных высокоэнергетических полимеров, играют значительную роль во многих отраслях промышленности. После своего непреднамеренного открытия НЦ прочно зарекомендовали себя как материал с исключительными свойствами [1, 2]. Наряду с традиционным использованием промышленных марок НЦ в последнее время наметилась тенденция применения их в новых наукоемких областях. Актуальность разработки новых типов НЦ, в основном с массовой долей (м.д.) азота менее 12,2%, определяется также необходимостью расширения номенклатуры и получения конкурентоспособных марок НЦ для изготовления печатных и флексографических красок, пленок, быстросохнущего лака, мембран и целлулоида [3–7]. Кроме того, нитрование целлюлозы как фундаментальный пример химической модификации целлюлозы по-прежнему является предметом многостороннего исследования во всем мире [8].

Наилучшим природным источником сырья с исключительными физико-химическими и структурно-морфологическими свойствами для получения НЦ высокого качества по-прежнему остается хлопковая целлюлоза (ХЦ). Тем не менее с точки зрения мировой науки достойной альтернативой ХЦ могут стать нетрадиционные легковозобновляемые растительные источники, основными преимуществами которых являются доступность, быстрая скорость возобновления и биоразлагаемость. Проведенные в ряде стран исследования показали [9–16], что на основе целлюлозы, выделенной из альтернативных растительных источников, возможно получение широкой номенклатуры НЦ. Следует отметить, что перечень такого рода источников сырья ежегодно пополняется, а способы получения высококачественной целлюлозы для НЦ постоянно совершенствуются.

На территории нашей страны в настоящее время одним из перспективных национальных сырьевых ресурсов может быть рассмотрен мискантус (*Miscanthus × giganteus*) [17–20], в частности сорт Камис, включенный в государственный селекционный реестр в 2018 году. Данный сорт мискантуса характеризуется высокой продуктивностью начиная со 2–3 года высадки плантации и в среднем составляет около 18–20 т/га год [21]. Однако использование целлюлозы, выделенной из представленного сорта, в качестве объекта химической функционализации в НЦ до настоящего времени в мировой практике не изучено и не описано, за исключением собственных единичных результатов, что обусловливает несомненную актуальность данного исследования.

Целями настоящей работы являлись синтез НЦ из опытной партии технической целлюлозы (ТЦ), выделенной из мискантуса сорта Камис в опытно-промышленных условиях; определение основных функциональных и физико-химических свойств полученного образца НЦ; изучение структурных особенностей опытной партии ТЦ и образца НЦ современными инструментальными методами исследования: ИК-Фурье спектроскопии, растровой электронной микроскопии (РЭМ), совмещенного термогравиметрического (ТГА) и дифференциально-термического (ДТА) анализов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве исходного сырья была использована сухая биомасса мискантуса (*Miscanthus × giganteus*) сорта Камис массой 30 кг, предоставленная ООО «Мастер БРЭНД» (пос. Митинка, Калужская область, Россия). Сырье предварительно измельчали на соломорезке и отбирали фракцию размером частиц 2,5–8 мм. Выделение опытной партии ТЦ вели в опытно-промышленных условиях путем последовательной обработки сырья разбавленными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия [22]. Процесс обработки проводили в реакторе объемом 250 л при перемешивании. В табл. 1

представлены компонентный состав сырья и опытной партии ТЦ, определенные по общепринятым в мировой практике методам [23] на сертифицированном аналитическом оборудовании.

Синтез НЦ проводили с использованием промышленно доступной серно-азотной кислотной смеси в ранее установленных нами для нетрадиционного растительного сырья условиях [9–11]. Основные функциональные свойства НЦ были определены согласно исследованиям [9–11]. М.д. азота в НЦ определяли ферросульфатным способом [24], который основан на омылении НЦ концентрированной серной кислотой и восстановлении образовавшейся азотной кислоты сульфатом железа (II) до оксида азота (II), которая с избытком последнего образует комплексное соединение $[Fe(NO)]SO_4$, окрашивающее раствор в желтовато-розовый цвет. Растворимость НЦ (1 г) в ацетоне (50 мл) определяли путем фильтрации нерастворимого в ацетоне остатка НЦ с последующим высушиванием и взвешиванием. Вязкость НЦ определяли путем измерения времени истечения 2%-го ацетонового раствора из капиллярного стеклянного вискозиметра ВПЖ-1 (ООО «Экросхим», Россия). Растворимость НЦ устанавливали по методу, основанному на растворении НЦ в спиртоэфирном растворителе при объемном соотношении этилового спирта к диэтиловому эфиру, равном 1:2, с последующей фильтрацией, сушкой и взвешивании нерастворившегося остатка. Выход НЦ рассчитывали по формуле:

$$W = (m_{пр} \times 100) / m_{исх},$$

где $m_{пр}$ – масса синтезированного НЦ, г; $m_{исх}$ – масса исходной ТЦ, г.

Опытная партия ТЦ и образец НЦ были исследованы методами ИК-Фурье спектроскопии с использованием Фурье-спектрометра ФТ-801 (ООО НПФ «Люмэкс-Сибирь», Россия) в диапазоне частот 4000–500 $см^{-1}$, РЭМ при помощи сканирующего электронного микроскопа JEOL GSM 840 (Jeol Ltd., Япония). Образец НЦ был исследован совместным ТГА/ДТА на термоанализаторе TGA/DTG-60 (Shimadzu, Япония) в следующих условиях: масса навески – 0,5 мг, скорость нагрева – 10 °С/мин, максимальная температура – 350 °С, среда инертная – азот.

Работа выполнена с использованием приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате выполненных исследований по определению компонентного состава мискантуса сорта Камис (см. табл. 1) было установлено, что представленный сорт характеризуется высоким содержанием целлюлозы по Кюршнеру (50,2%) при относительно низких уровнях лигнина (19,5%) и золы (1,63%). М.д. пентозанов составила 21,2%. В целом компонентный состав мискантуса сорта Камис сопоставим с другими сортами *Miscanthus* × *giganteus* [25, 26].

Согласно данным, представленным в табл. 1, полученная в опытно-промышленных условиях опытная партия ТЦ характеризуется высокими значениями м.д. α-целлюлозы – 92,8% и степени полимеризации (СП) – 1200 с суммарной м.д. нецеллюлозых компонентов 3,13%.

Учитывая требования, предъявляемые к целлюлозе, пригодной для химической переработки (минимальное содержание лигнина, гемицеллюлоз, золы и посторонних включений), т.е. к высококачественной целлюлозе [15], в целом результаты, полученные по качеству опытной партии ТЦ, выделенной азотнокислым способом из мискантуса сорта Камис в опытно-промышленных условиях, не исключают возможности ее успешной химической модификации в высококачественные НЦ.

Анализ мировой литературы в области синтеза НЦ показал, что получение НЦ возможно из целлюлоз, выделенных из широкого многообразия целлюлозосодержащего растительного сырья (табл. 2). Кроме того, мировыми учеными показана не только принципиальная возможность получения НЦ с широким диапазоном по м.д. азота – 10,80–12,40% [25–28], но и возможность получения НЦ с удовлетворительными функциональными свойствами, включая вязкость и растворимость [13–15, 19–24, 29–31]. Также во многих работах имеется информация об исследованиях НЦ из альтернативного сырья современными инструментальными методами, подтверждающая получение именно азотнокислых эфиров целлюлозы с уникальной морфологией волокна.

В результате анализа мировой литературы в области альтернативных растительных источников целлюлозы, пригодных для синтеза НЦ (табл. 2), установлено, что примеры химической функционализации целлюлозы из мискантуса гигантского сорта Камис в НЦ отсутствуют в мировой практике.

Согласно результатам, представленным в табл. 2, полученный при использовании промышленной серно-азотной кислотной смеси образец НЦ из опытной партии ТЦ характеризуется следующими основными функциональными свойствами: м.д. азота – 11,18%, вязкость – 48 мПа·с, растворимость в спиртоэфирной смеси – 94%. Кроме того, предельно высокая 100%-я

Таблица 1. Компонентный состав мискантуса сорта Камис и опытной партии технической целлюлозы, выделенной из него азотнокислым способом в опытно-промышленных условиях

Table 1. Components of *Miscanthus* × *giganteus* var. KAMIS and of the pilot batch of cellulose pulp isolated therefrom by the nitric acid method under pilot production conditions

Наименование образца	М.д. компонентов*, %				Степень полимеризации
	целлюлоза	лигнин	пентозаны	зола	
Мискантус	50,2±0,5**	19,50±0,5	21,2±0,5	1,63±0,05	–
Техническая целлюлоза из мискантуса	92,8±0,5***	1,10±0,05	1,60±0,05	0,43±0,05	1200

Примечание. * – в пересчете на абсолютно сухое сырье; ** – целлюлоза по Кюршнеру; *** – α-целлюлоза.

Таблица 2. Свойства образцов нитратов целлюлозы из альтернативных растительных источников сырья

Table 2. Properties of cellulose nitrates obtained from alternative plant feedstocks

Источник целлюлозы для синтеза нитратов целлюлозы	Основные функциональные свойства нитратов целлюлозы			ИК	РЭМ	ТГА/ДТА ($T_{НИР}$, °C)	Ссылка на источник
	м.д. азота, %	условная вязкость, мПа	растворимость*, %				
Лен-долгунец	8,90–12,40	2–24	–**	-	-	-	15
	10,64–12,41	0,6–15,8	100	+	+	196–198	16
Лен-долгунец (сорт Мерелин)	12,03	10,6	100	-	-	-	27
	12,10	15,8	100	-	-	-	
Солома льна-межеумка	12,23–12,34	2,7–16,0	95–96	+	-	198	28
	11,99–12,08	8,0-12,0	98	+	+	-	29
Пенька	12,40	4,2	–	+	-	-	30
	12,40	–	–	+	-	-	31
Древесные опилки	11,20–12,40	–	–	-	-	-	32
Ризофора	11,40	–	–	-	-	-	12
Кенаф	11,30	–	–	-	-	-	
Масличная пальма	10,80	–	–	-	-	-	
Стебли табака	11,00–11,50	–	–	-	-	-	13
Стебли горького бамбука	12,50	79	–	+	+	194	14
Плодовые оболочки овса	12,08–12,18	12–15	98	+	-	-	9
	12,12	10	98	+	-	205	10
	11,61	93	91	+	+	-	11
Miscanthus sacchari-florus (Maxim.) сорта Сорановский	11,85	18	97	+	+	201	33
	11,74–12,38	9–35	93–98	+	+	198	34
Miscanthus × *giganteus* сорта Камис	11,18	48	94	+	+	197	данная работа

Примечание. *– указана растворимость нитратов целлюлозы в спиртоэфирном растворителе; **– данные отсутствуют в публикации.

растворимость образца НЦ в ацетоне подтверждает получение именно азотнокислых эфиров целлюлозы [35]. Необходимо подчеркнуть, что синтез НЦ характеризуется высоким значением выхода – 150%.

На рис. 1 представлены результаты исследования методом ИК-Фурье спектроскопии [36, 37] опытной партии ТЦ из мискантуса сорта Камис и синтезированного образца НЦ.

В ИК-спектре опытной партии ТЦ (рис. 1, *a*) выявлено наличие основных функциональных групп (3384, 2902, 1639, 1428, 1370, 1319, 1161, 700–500 $см^{-1}$), позволяющих идентифицировать опытную партию ТЦ из мискантуса сорта Камис как целлюлозу, сопоставимую по пикам валентных колебаний с классической целлюлозой [15]. Обнаружено, что в спектре опытной партии ТЦ (см. рис. 1, *a*) отсутствуют пики валентных колебаний, отвечающие за наличие примесных компонентов: ароматических структур лигнина – около 1500 $см^{-1}$ и гемицеллюлоз – около 1700 $см^{-1}$, что еще раз подтверждает высокое качество ТЦ.

В ИК-спектре НЦ (рис. 1, *b*) зарегистрированы характеристические частоты, свидетельствующие о получении именно азотнокислого эфира целлюлозы (1659, 1278, 834, 746, 683 $см^{-1}$). Интенсивная полоса поглощения в области 1659 $см^{-1}$ отвечает за колебания $\nu_a(NO_2)$ нитратных групп, связанных с CH_2-группами глюкопиранозных циклов НЦ (положение $C_{(6)}$). Полоса поглощения в области 1278 $см^{-1}$ может быть отнесена к валентным симметричным колебаниям нитратных групп. Полосы поглощения в областях 834, 746 и 683 $см^{-1}$ соответствуют колебаниям нитратных групп: валентному $\nu_a(NO_2)$, веерному $\gamma_w(NO_2)$ и ножничному $\delta(NO_2)$ соответственно.

Помимо основных полос поглощения, отвечающих за валентные колебания нитратных групп, в области 3700–3200 $см^{-1}$ содержатся пики валентных колебаний ν(OH) в виде широкой полосы сложного контура, что свидетельствует о неполном замещении НЦ. Пики валентных колебаний в данной области принадлежат гидроксильным группам НЦ, участвующим в образовании водородных связей, и являются характерным признаком химической неоднородности сложного эфира. Полученные данные хорошо согласуются с данными для других альтернативных источников НЦ [9–11, 14, 16, 28–31, 38–41].

На рис. 2 представлены микрофотографии (диапазон увеличений ×200 и ×50000 раз) опытной партии ТЦ из мискантуса сорта Камис (рис. 2, *a*, *b*) и синтезированного образца НЦ (рис. 2, *c*, *d*).

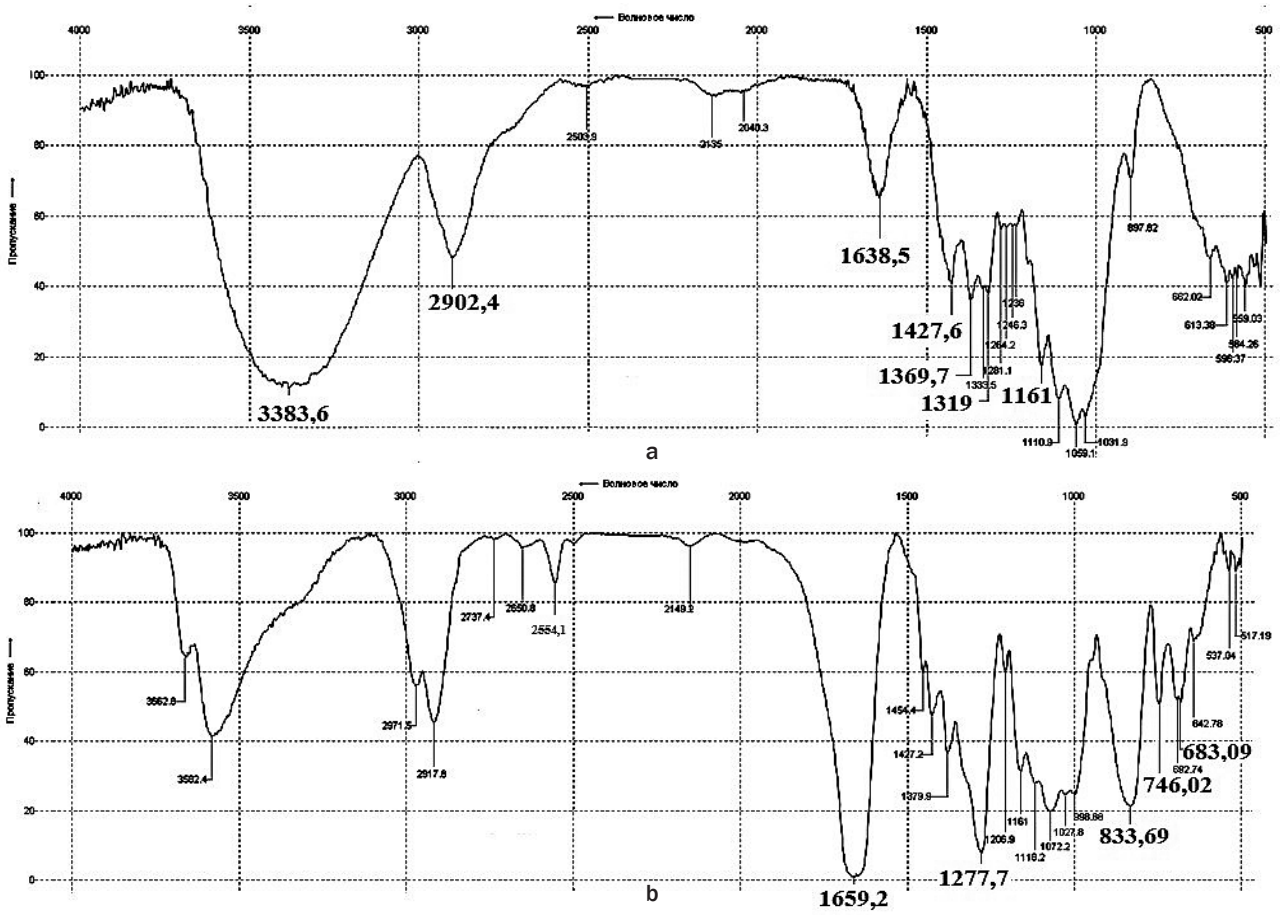
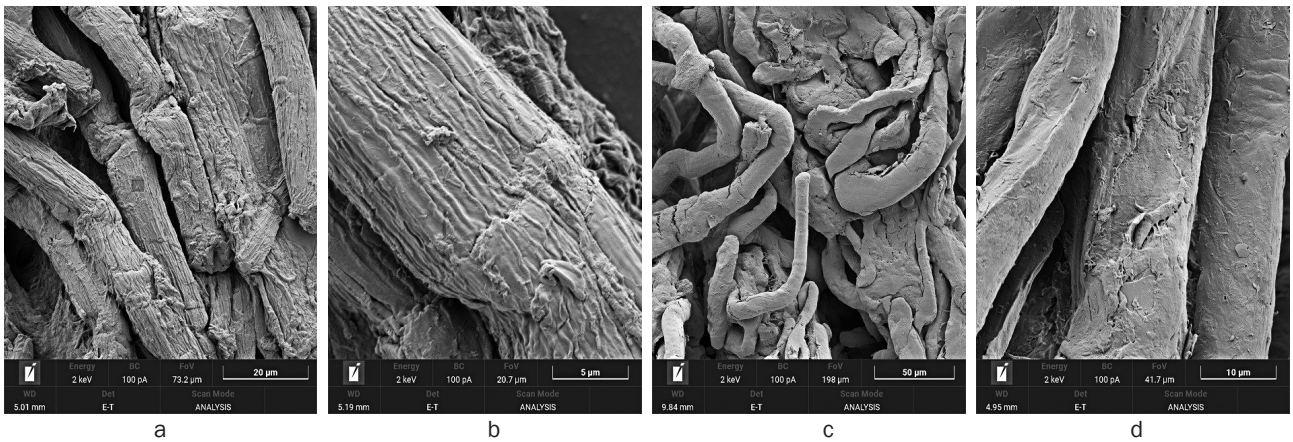


Рис. 1. ИК-спектры: a – опытной партии технической целлюлозы из мискантуса сорта Камис; b – образец нитратов целлюлозы из опытной партии технической целлюлозы мискантуса сорта Камис

Fig. 1. IR spectra: a – pilot batch of cellulose pulp from *Miscanthus* × *giganteus* var. KAMIS; b – cellulose nitrate sample from the pilot batch of cellulose pulp



a b c d

Рис. 2. Микрофотографии опытной партии технической целлюлозы из мискантуса сорта Камис (a, b) и нитратов целлюлозы из опытной партии технической целлюлозы мискантуса сорта Камис (c, d)

Fig. 2. SEM images of pilot batch of cellulose pulp from *Miscanthus* × *giganteus* var. KAMIS (a, b) and cellulose nitrate from the pilot batch of cellulose pulp (c, d)

Электронно-микроскопическое исследование показало, что опытная партия ТЦ (рис. 2, *a*) представляет собой смесь, состоящую из неоднородных по форме и размерам трубкообразных целлюлозных волокон, поверхность которых характеризуется наличием микрошероховатостей (рис. 2, *b*). Согласно рис. 2, *c*, в результате обработки исходной ТЦ серно-азотной кислотной смесью нитратцеллюлозные волокна в основном сохраняют форму волокон исходной ТЦ. Необходимо отметить, что в результате набухания волокон ТЦ в реакционной смеси волокна НЦ становятся более объемными, а их поверхность сглаживается (рис. 2, *d*). Сравнивая морфологию волокон исходной целлюлозы и морфологию нитрат-

целлюлозных волокон, синтезированных НЦ из других альтернативных источников, можно констатировать их сходство по неоднородности формы и размерам, а также по их видоизменению по окончании нитрования – увеличению в объеме и сглаживанию поверхности [11, 14, 16, 29, 33, 38, 39].

В результате дополнительного исследования синтезированного образца НЦ из опытной партии ТЦ мискантуса сорта Камис методом совмещенного ТГА/ДТА установлены высокие значения температуры начала интенсивного разложения НЦ – 197 °С и удельной теплоты разложения – 6,92 кДж/г. Кроме того, обнаружено, что термическое разложение образца составило 93%. Полученные данные свидетельствуют о высокой химической чистоте синтезированного продукта. В сравнении с данными температуры начала интенсивного разложения НЦ из других источников можно отметить их близкое соответствие [10, 11, 14, 16, 28, 33, 34, 38–41].

ВЫВОДЫ

На основе мискантуса гигантского сорта Камис с содержанием целлюлозы по Кюршнеру 50,2% в условиях опытно-промышленного производства азотнокислым способом выделена опытная партия ТЦ, характеризующаяся высокими значениями м.д. α-целлюлозы – 92,8% и СП – 1200. В результате обработки опытной партии ТЦ промышленной серно-азотной кислотной смесью получен образец НЦ с основными функциональными свойствами: м.д. азота 11,18%, вязкостью 48 мПа·с и растворимостью 94%. Выявлено, что образец НЦ характеризуется предельно высокой растворимостью в ацетоне – 100% и высоким значением выхода – 150%. Методом ИК-Фурье спектроскопии установлена принадлежность опытной партии ТЦ (3384, 2902, 1639, 1428, 1370, 1319, 1161, 700–500 $см^{-1}$) к целлюлозе, а образца НЦ на ее основе (1659, 1278, 834, 746, 683 $см^{-1}$) – к азотнокислому эфиру целлюлозы. Методом РЭМ обнаружено, что опытная партия ТЦ из мискантуса сорта Камис представляет собой смесь, состоящую из неоднородных по форме и размерам трубкообразных волокон, на поверхности которых имеются микрошероховатости. Волокна образца НЦ в основном сохраняют форму волокон исходной ТЦ с незначительным увеличением по объему. Поверхность нитратцеллюлозных волокон в результате обработки реакционной смесью становится более гладкой. Методом совмещенного ТГА/ДТА установлены высокая температура начала интенсивного разложения – 197 °С и удельная теплота разложения – 6,92 кДж/г, что свидетельствует о высокой химической чистоте НЦ. Практическая значимость представленных в данной работе результатов заключается в использовании в качестве сырья для химической функционализации в широко востребованные НЦ нового перспективного альтернативного сырьевого ресурса – мискантуса гигантского сорта Камис.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Misenan M.S.M., Norrrahim M.N.F., Saad M.M., Shaffie A.H., Zulkipli N.A., Farabi M.A. Recent advances in nitrocellulose-based composites // Synthetic and Natural Nanofillers in Polymer Composites. 2023. P. 399–415. https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19053-7.00004-4.

2. Tarchoun A.F., Trache D., Abdelaziz A., Harrat A., Boukecha W.O., Hamouche M.A., et al. Elaboration, characterization and thermal decomposition kinetics of new nanoenergetic composite based on hydrazine 3-nitro-1,2,4-triazol-5-one and nanostructured cellulose nitrate // Molecules. 2022. Vol. 27, no. 20. P. 6945. https://doi.org/10.3390/molecules27206945.

3. Carter E.A., Swarbrick B., Harrison T.M., Ronai L. Rapid identification of cellulose nitrate and cellulose acetate film in historic photograph collections // Heritage Science. 2020. Vol. 8, no. 1. P. 51. https://doi.org/10.1186/s40494-020-00395-y.

4. Costa A.M.F., de Aguiar Filho S.Q., Santos T.J., Pereira D.H. Theoretical insights about the possibility of removing Pb2+ and Hg2+ metal ions using adsorptive processes and matrices of carboxymethyl diethylaminoethyl cellulose and cellulose nitrate biopolymers // Journal of Molecular Liquids. 2021. Vol. 331. P. 115730. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115730.

5. Gouda A.A., El Sheikh R., Youssef A.O., Gouda N., Gamil W., Khadrajy H.A. Preconcentration and separation of Cd(II), Co(II), Cu(II), Ni(II), and Pb(II) in environmental samples on cellulose nitrate membrane filter prior to their flame atomic absorption spectroscopy determinations // International Journal of Environmental Analytical Chemistry. 2020. Vol. 100, no. 4. P. 364–377. https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1858070.

6. Roldão É., Parola A.J., Vilarigues M., Lavédrine B., Ramos A.M. Unveiling the colours of cellulose nitrate black and white film-based negatives in colonial photography // Studies in Conservation. 2019. Vol. 65, no. 2. P. 1–9. https://doi.org/10.1080/00393630.2019.1662672.

7. Ioelovich M.J.I. Study of thermal energy of alternative solid fuels // Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2018. Vol. 8, no. 4. P. 117–124. http://dx.doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-4-117-124.

8. Zhang Y., Deng W., Wu M., Rahmaninia M., Xu C., Li B. Tailoring functionality of nanocellulose: current status and critical challenges // Nanomaterials. 2023. Vol. 13. P. 1489. https://doi.org/10.3390/nano13091489.

9. Korchagina A.A., Budaeva V.V., Kukhlenko A.A. Esterification of oat-hull cellulose // Russian Chemical Bulletin. 2019. Vol. 68, no. 6. P. 1282–1288. https://doi.org/10.1007/s11172-019-2554-8.

10. Sakovich G.V., Budaeva V.V., Korchagina A.A., Gismatulina Yu.A., Kozyrev N.V., Vakutin A.G. Oat-hull cellulose nitrates for explosive compositions // Doklady Chemistry. 2019. Vol. 487, no. 2. P. 221–225. https://doi.org/10.1134/S0012500819080020.

11. Korchagina A.A., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Lyukhanova I.V., Bychin N.V., Sakovich G.V. Modification of plant cellulose and its synthetic analogue into low-substituted esterification products // ChemChemTech. 2022. Vol. 65, no. 6. P. 64–74. https://doi.org/10.6060/ivkkt.20226506.6598.

12. Yolhamid M.N.A.G., Ibrahim F., Zarim M.A.U.A.A., Ibrahim R., Adnan S., Yahya M.Z.A. The processing of nitrocellulose from rhizophora, palm oil bunches (EFB) and kenaf fibres as a propellant grade // International Journal of Engineering & Technology. 2018. Vol. 7, no. 4. P. 59–65.

13. Muvhiiwa R., Mawere E., Moyo L.B., Tshuma L. Utilization of cellulose in tobacco (*Nicotiana tobacum*) stalks for nitrocellulose production // Heliyon. 2021. Vol. 7, no. 7. P. e07598. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07598.

14. Duan X., Li Z., Shi X., Pe C. Giant panda feces: potential raw material in preparation of nitrocellulose for propellants // Cellulose. 2023. Vol. 30. P. 3127–3140. https://doi.org/10.1007/s10570-023-05054-6.

15. Торгун И.Н., Никишов В.П., Бучнев И.И., Куценко Г.В., Ибрагимов Н.Г., Иванова И.П. [и др.]. Лен в пороховой промышленности: монография. М.: ФГУП «ЦНИИХМ», 2012. 248 с. EDN: SJIEYB.

16. Бобков С.А., Никишов В.П. Перспективы использования льняного сырья в интересах Министерства обороны Российской Федерации // Известия Российской академии ракетных и артиллерийских наук. 2019. N 3. С. 38–43. EDN: NEULDA.

17. Витебская А.В., Остроглядова О.И. Развитие потенциала Калининградской области за счет возобновляемых альтернативных источников энергии // Бизнес. Образование. Право. 2023. Т. 62. N 1. С. 159–162. https://doi.org/10.25683/VOLBI.2023.62.576. EDN: JBIRLM.

18. Капустянчик С.Ю., Якименко В.Н. Мискантус – перспективная сырьевая, энергетическая и фитомелиоративная культура (литературный обзор) // Почвы и окружающая среда. 2020. Т. 3. N 3. С. 1–14. https://doi.org/10.31251/pos.v3i3.126. EDN: TAOQSK.

19. Gushchina V.A., Volodkin A.A., Ostroborodova N.I., Lykova A.S. The key aspects of the production process of *Myscanthus giganteus* under the conditions of the Middle Volga region // Volga Region Farmland. 2020. Vol. 4, no. 8. P. 32–37. https://doi.org/10.26177/VRF.2020.8.4.007.

20. Шавыркина Н.А., Гисматулина Ю.А., Будаева В.В. Перспективы химической и биотехнологической переработки мискантуса // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 383–393. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-383-393. EDN: VAZQGS.

21. Gismatulina Y.A., Budaeva V.V., Kortusov A.N., Kashcheyeva E.I., Gladysheva E.K., Mironova G.F., et al. Evaluation of chemical composition of *Miscanthus×giganteus* raised in different climate regions in Russia // Plants. 2022. Vol. 11, no. 20. P. 2791. https://doi.org/10.3390/plants11202791.

22. Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V. Chemical composition of five *Miscanthus sinensis* harvests and nitric-acid cellulose therefrom // Industrial Crops and Products. 2017. Vol. 109. P. 227–232 https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.026.

23. Ovchinnikova E.V., Mironova G.F., Banzaraktsaeva S.P., Skiba E.A., Budaeva V.V., Kovgan M.A., et al. Bioprocessing of oat hulls to ethylene: Impact of dilute HNO_3- or NaOH pretreatment on process efficiency and sustainability // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 2021. Vol. 9, no. 49. P. 16588–16596. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05112.

24. Gensh K.V., Kolosov P.V., Bazarnova N.G. Quantitative analysis of cellulose nitrates by Fourier transform infrared spectroscopy // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2011. Vol. 37, no. 7. P. 814–816. https://doi.org/10.1134/S1068162011070077.

25. Гисматулина Ю.А., Кортусов А.Н., Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование химического состава промышленно значимой для России культуры – мискантуса гигантского – урожаев 2019-2021 гг. // Экология и промышленность России. 2022. Т. 26. N 11. https://doi.org/10.18412/1816-0395-2022-11-55-59. EDN: LELATM.

26. Wang C., Kong Y., Hu R., Zhou G. Miscanthus: a fast–growing crop for environmental remediation and biofuel production // GCB Bioenergy. 2021. Vol. 13, no. 1. P. 58–69. https://doi.org/10.1111/gcbb.12761.

27. Пономарев Б.А., Русин Д.Л., Серегин В.В., Леонова Е.В., Беликова Т.А. Получение нитратов целлюлозы из льняной целлюлозы с учетом экономических и экологических факторов // Успехи в химии и химической технологии. 2011. Т. 25. N 12. С. 40–44. EDN: RARWVR.

28. Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Cellulose nitrates from intermediate flax straw // Russian Chemical Bulletin. 2016. Vol. 65, no. 12. P. 2920–2924. https://doi.org/10.1007/s11172-016-1678-3. EDN: XNEZVS.

29. Сакович Г.В., Будаева В.В., Корчагина А.А., Гисматулина Ю.А. Перспективы нитратов целлюлозы из нетрадиционного сырья для взрывчатых составов // Химия растительного сырья. 2019. N 1. С. 259–268. https://doi.org/10.14258/jcprm.2019014336. EDN: ZACFML.

30. Валишина З.Т., Иванова А.В., Мухаметшин Б.Ф., Александров А.А., Косточко А.В. Исследование свойств азотнокислых эфиров целлюлозы на основе пеньковой целлюлозы // Вестник технологического университета. 2016. Т. 19. N 18. С. 65–68. EDN: WYBSAT.

31. Валишина З.Т., Александров А.А., Хакимзянова Р.И., Косточко А.В. Исследование кинетики этерификации пеньковой целлюлозы // Вестник технологического университета. 2017. Т. 20. N 23. С. 13–16. EDN: YLCTQL.

32. Adekunle I.M. Production of cellulose nitrate polymer from sawdust // Journal of Chemistry. 2010. Vol. 7, no. 3. P. 709–716. https://doi.org/10.1155/2010/807980.

33. Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Nitrocellulose synthesis from miscanthus cellulose // Propellants, Explosives, Pyrotechnics. 2018. Vol. 43. P. 96–100. https://doi.org/10.1002/prep.201700210.

34. Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Nitric acid preparation of cellulose from miscanthus as a nitrocellulose precursor // Russian Chemical Bulletin. 2015. Vol. 64, no. 12. P. 2949–2953. https://doi.org/10.1007/s11172-015-1252-4.

35. Liu J. Nitrate esters chemistry and technology. Singapore: Springer Nature, 2019. P. 469–580.

36. Кушнир Е.Ю., Шахова А.Г., Базарнова Н.Г., Кымбатбекова М.К., Афанасенкова И.В. Делигнификация растительного сырья под воздействием микроволнового излучения. ИК-спектры и индексы упорядоченности целлюлозы // Химия растительного сырья. 2020. N 4. С. 101–107. https://doi.org/10.14258/jcprm.2020048962. EDN: QBVPHI.

37. Михаилиди А.М., Котельникова Н.Е., Геньш К.В., Кушнир Е.Ю., Базарнова Н.Г. Состав и свойства древесины и целлюлозы тропических пород растений // Химия растительного сырья. 2013. N 1. С. 15–28. EDN: RCYJXT.

38. Trache D., Khimeche K., Mezroua A., Benziane M. Physicochemical properties of microcrystalline nitrocellulose from Alfa grass fibres and its thermal stability // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2016. Vol. 124, no. 3. P. 1485–1496. https://doi.org/10.1007/s10973-016-5293-1.

39. Tarchoun A.F., Trache D., Klapötke T.M., Chelouche S., Derradji M., Bessa W., et al. A promising energetic polymer from *Posidonia oceanica* brown algae: synthesis, characterization, and kinetic modeling // Macromolecular Chemistry and Physics. 2019. Vol. 220, no. 22. P. 1900358. https://doi.org/10.1002/macp.201900358.

40. Tarchoun A.F., Trache D., Klapötke T.M., Belmerabet M., Abdelaziz A., Derradji M., et al. Synthesis, characterization, and thermal decomposition kinetics of nitrogen-rich energetic biopolymers from aminated giant reed cellulosic fibers // Industrial & Engineering Chemistry Research. 2020. Vol. 59, no. 52. P. 22677–22689. https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c05448.

41. Tarchoun A.F., Trache D., Klapötke T.M., Selmani A., Saada M., Chelouche S., et al. New insensitive high-energy dense biopolymers from giant reed cellulosic fibers: their synthesis, characterization, and non-isothermal decomposition kinetics // New Journal of Chemistry. 2021. Vol. 45, no. 11. P. 5099–5113. https://doi.org/10.1039/d0nj05484d.

REFERENCES

1. Misenan M.S.M., Norrrahim M.N.F., Saad M.M., Shaffie A.H., Zulkipli N.A., Farabi M.A. Recent advances in nitrocellulose-based composites. *Synthetic and Natural Nanofillers in Polymer Composites.* 2023;399-415. https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19053-7.00004-4.

2. Tarchoun A.F., Trache D., Abdelaziz A., Harrat A., Boukecha W.O., Hamouche M.A., et al. Elaboration, characterization and thermal decomposition kinetics of new nanoenergetic composite based on hydrazine 3-nitro-1, 2, 4-triazol-5-one and nanostructured cellulose nitrate. *Molecules*. 2022;27(20):6945. https://doi.org/10.3390/molecules27206945.

3. Carter E.A., Swarbrick B., Harrison T.M., Ronai L. Rapid identification of cellulose nitrate and cellulose acetate film in historic photograph collections. *Heritage Science.* 2020;8(1):51. https://doi.org/10.1186/s40494-020-00395-y.

4. Costa A.M.F., de Aguiar Filho S.Q., Santos T.J., Pereira D.H. Theoretical insights about the possibility of removing Pb2+ and Hg2+ metal ions using adsorptive processes and matrices of carboxymethyl diethylaminoethyl cellulose and cellulose nitrate biopolymers. *Journal of Molecular Liquids.* 2021;331:115730. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115730.

5. Gouda A.A., El Sheikh R., Youssef A.O., Gouda N., Gamil W., Khadrajy H.A. Preconcentration and separation of Cd(II), Co(II), Cu(II), Ni(II), and Pb(II) in environmental samples on cellulose nitrate membrane filter prior to their flame atomic absorption spectroscopy determinations. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry.* 2020;100(4):364-377. https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1858070.

6. Roldão E., Parola A.J., Vilarigues M., Lavédrine B., Ramos A.M. Unveiling the colours of cellulose nitrate black and white film-based negatives in colonial photography. *Studies in Conservation.* 2019;65(2):1-9. https://doi.org/10.1080/00393630.2019.1662672.

7. Ioelovich M.J.I. Study of thermal energy of alternative solid fuels. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2018;8(4):117-124. http://dx.doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-4-117-124.

8. Zhang Y., Deng W., Wu M., Rahmaninia M., Xu C., Li B. Tailoring functionality of nanocellulose: current status and critical challenges. *Nanomaterials.* 2023;13:1489. https://doi.org/10.3390/nano13091489.

9. Korchagina A.A., Budaeva V.V., Kukhlenko A.A. Esterification of oat-hull cellulose. *Russian Chemical Bulletin.* 2019;68(6):1282-1288. https://doi.org/10.1007/s11172-019-2554-8.

10. Sakovich G.V., Budaeva V.V., Korchagina A.A., Gismatulina Yu.A., Kozyrev N.V., Vakutin A.G. Oat-hull cellulose nitrates for explosive compositions. *Doklady Chemistry.* 2019;487(2):221-225. https://doi.org/10.1134/S0012500819080020.

11. Korchagina A.A., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Lyukhanova I.V., Bychin N.V., Sakovich G.V. Modification of plant cellulose and its synthetic analogue into low-substituted esterification products. *ChemChemTech.* 2022;65(6):64-74. https://doi.org/10.6060/ivkkt.20226506.6598.

12. Yolhamid M.N.A.G., Ibrahim F., Zarim M.A.U.A.A., Ibrahim R., Adnan S., Yahya M.Z.A. The processing of nitrocellulose from rhizophora, palm oil bunches (EFB) and kenaf fibres as a propellant grade. *International Journal of Engineering & Technology.* 2018;7(4):59-65.

13. Muvhiiwa R., Mawere E., Moyo L.B., Tshuma L. Utilization of cellulose in tobacco (*Nicotiana tobacum*) stalks for nitrocellulose production. *Heliyon.* 2021;7(7):e07598. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07598.

14. Duan X., Li Z., Shi X., Pe C. Giant panda feces: potential raw material in preparation of nitrocellulose for propellants. *Cellulose.* 2023;30:3127-3140. https://doi.org/10.1007/s10570-023-05054-6.

15. Torgun I.N., Nikishov V.P., Buchnev I.I., Kutsenko G.V., Ibragimov N.G., Ivanova I.P., et al. *Flax in the powder industry: monograph.* Moscow: FGUP "TsNIIKhM"; 2012. 248 p. (In Russian). EDN: SJIEYB.

16. Bobkov S.A., Nikishov V.P. Prospects for the use of flax raw materials for the Ministry of defence of the Russian Federation. *Izvestiya Rossiiskoi akademii raketnykh i artilleriiskikh nauk.* 2019;(3):38-43. (In Russian). EDN: NEULDA.

17. Vitebskaya A.V., Ostroglyadova O.I. Developing the potential of the Kaliningrad region through renewable alternative energy sources. *Biznes. Obrazovanie. Pravo = Business. Education. Right.* 2023;62(1):159-162. (In Russian). https://doi.org/10.25683/VOLBI.2023.62.576. EDN: JBIRLM.

18. Kapustyanchik S.Yu., Yakimenko V.N. Miscantus is promising raw material, energy and phytomeliorative

crop. *Pochvy i okruzhayushchaya sreda = The Journal of Soils and Environment.* 2020;3(3):1-14. (In Russian). https://doi.org/10.31251/pos.v3i3.126. EDN: TAOQSK.

19. Gushchina V.A., Volodkin A.A., Ostroborodova N.I., Lykova A.S. The key aspects of the production process of *Myscanthus giganteus* under the conditions of the Middle Volga region. *Volga Region Farmland.* 2020;4(8):32-37. https://doi.org/10.26177/VRF.2020.8.4.007.

20. Shavyrkina N.A., Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V. Prospects for chemical and biotechnological processing of miscanthus. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):383-393. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-383-393. EDN: VAZQGS.

21. Gismatulina Y.A., Budaeva V.V., Kortusov A.N., Kashcheyeva E.I., Gladysheva E.K., Mironova G.F., et al. Evaluation of chemical composition of *Miscanthus×giganteus* raised in different climate regions in Russia. *Plants.* 2022;11(20):2791. https://doi.org/10.3390/plants11202791.

22. Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V. Chemical composition of five *Miscanthus sinensis* harvests and nitric-acid cellulose therefrom. *Industrial Crops and Products.* 2017;109:227-232 https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.026.

23. Ovchinnikova E.V., Mironova G.F., Banzaraktsaeva S.P., Skiba E.A., Budaeva V.V., Kovgan M.A., et al. Bioprocessing of oat hulls to ethylene: Impact of dilute HNO_3- or NaOH pretreatment on process efficiency and sustainability. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering.* 2021;9(49):16588-16596. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05112.

24. Gensh K.V., Kolosov P.V., Bazarnova N.G. Quantitative analysis of cellulose nitrates by Fourier transform infrared spectroscopy. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2011;37(7):814-816. https://doi.org/10.1134/S1068162011070077.

25. Gismatulina Yu.A., Kortusov A.N., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Study of chemical composition of an industrial crop for Russia – Miscanthus giganteus harvested in 2019-2021. *Ekologiya i promyshlennost' Rossii = Ecology and Industry of Russia.* 2022;26(11):55-59. (In Russian). https://doi.org/10.18412/1816-0395-2022-11-55-59. EDN: LELATM.

26. Wang C., Kong Y., Hu R., Zhou G. Miscanthus: a fast–growing crop for environmental remediation and biofuel production. *GCB Bioenergy.* 2021;13(1):58-69. https://doi.org/10.1111/gcbb.12761.

27. Ponomarev B.A., Rusin D.L., Seregin V.V., Leonova E.V., Belikova T.A. Obtaining cellulose nitrates from flax pulp, taking into account economic and environmental factors. *Uspekhi v khimii i khimicheskoi tekhnologii.* 2011;25(12):40-44. (In Russian). EDN: RARWVR.

28. Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Cellulose nitrates from intermediate flax straw. *Russian Chemical Bulletin.* 2016;65(12):2920-2924. https://doi.org/10.1007/s11172-016-1678-3. EDN: XNEZVS.

29. Sakovich G.V., Budaeva V.V., Korchagina A.A., Gismatulina Yu.A. Prospects of cellulose nitrates from unconventional feedstocks for use in composite explosives. *Khimiya rastitelnogo syrya.* 2019;(1):259-268. (In Russian). https://doi.org/10.14258/jcprm.2019014336. EDN: ZACFML.

30. Valishina Z.T., Ivanova A.V., Mukhametshin B.F., Aleksandrov A.A., Kostochko A.V. Study of properties of cellulose nitrate esters based on hemp cellulose. *Vestnik tehnologicheskogo universiteta.* 2016;19(18):65-68. (In Russian). EDN: WYBSAT.

31. Valishina Z.T., Alexandrov A.A., Khakimzya-nova R.I., Kostochko A.V. Study of the esterification kinetics of hemp cellulose. *Vestnik tehnologicheskogo universiteta.* 2017;20(23):13-16. (In Russian). EDN: YLCTQL.

32. Adekunle I.M. Production of cellulose nitrate polymer from sawdust. *Journal of Chemistry.* 2010;7(3):709-716. https://doi.org/10.1155/2010/807980.

33. Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Nitrocellulose synthesis from miscanthus cellulose. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics.* 2018;43:96-100. https://doi.org/10.1002/prep.201700210.

34. Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Nitric acid preparation of cellulose from miscanthus as a nitrocellulose precursor. *Russian Chemical Bulletin.* 2015;64(12):2949-2953. https://doi.org/10.1007/s11172-015-1252-4.

35. Liu J. *Nitrate esters chemistry and technology*. Singapore: Springer Nature; 2019, p. 469-580.

36. Kushnir E.Yu., Shakhova A.G., Bazarnova N.G., Kymbatbekova M.K., Afanasenkova I.V. Delignification of plant raw materials under microwave irradiation. IR spectra and ordering indices of the cellulose. *Khimiya rastitelnogo syrya.* 2020;(4):101-107. (In Russian). https://doi.org/10.14258/jcprm.2020048962. EDN: QBVPHI.

37. Mihailidi A.M., Kotel'nikova N.E., Gen'sh K.V., Kushnir E.Ju., Bazarnova N.G. The composition and properties of wood and cellulose of tropical plant species. *Khimiya rastitelnogo syrya.* 2013;(1):15-28. (In Russian). EDN: RCYJXT.

38. Trache D., Khimeche K., Mezroua A., Benziane M. Physicochemical properties of microcrystalline nitrocellulose from Alfa grass fibres and its thermal stability. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 2016;124(3):1485-1496. https://doi.org/10.1007/s10973-016-5293-1.

39. Tarchoun A.F., Trache D., Klapötke T.M., Chelouche S., Derradji M., Bessa W., et al. A promising energetic polymer from *Posidonia oceanica* brown algae: synthesis, characterization, and kinetic modeling. *Macromolecular Chemistry and Physics.* 2019;220(22):1900358. https://doi.org/10.1002/macp.201900358.

40. Tarchoun A.F., Trache D., Klapötke T.M., Belmerabet M., Abdelaziz A., Derradji M., et al. Synthesis, characterization, and thermal decomposition kinetics of nitrogen-rich energetic biopolymers from aminated giant reed cellulosic fibers. *Industrial & Engineering Chemistry Research.* 2020;59(52):22677-22689. https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c05448.

41. Tarchoun A.F., Trache D., Klapötke T.M., Selmani A., Saada M., Chelouche S., et al. New insensitive high-energy dense biopolymers from giant reed cellulosic fibers: their synthesis, characterization, and non-isothermal decomposition kinetics. *New Journal of Chemistry.* 2021;45(11):5099-5113. https://doi.org/10.1039/d0nj05484d.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Корчагина Анна Александровна,
к.т.н., научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
yakusheva89_21.ru@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-3633-2392

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 20.06.2023.
Одобрена после рецензирования 18.07.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Anna A. Korchagina
Cand. Sci. (Engineering), Researcher,
Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of the Siberian Branch SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., 659322, Biysk,
Russian Federation,
yakusheva89_21.ru@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-3633-2392

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

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.

Информация о статье

The article was submitted 20.06.2023.
Approved after reviewing 18.07.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 615.32:634.2
EDN: HWYQXA
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-402-408

Содержание каротиноидов в плодах абрикоса *Prunus armeniaca* L. в зависимости от способа извлечения

М.В. Семенова✉, А.Г. Куклина, В.В. Кондратьева, Л.С. Олехнович, Т.В. Воронкова

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, г. Москва, Российская Федерация

Аннотация. *В середине XX века в Москве, в Главном ботаническом саду им. Н.В. Цицина РАН, был собран ценный генофонд абрикоса, отличающийся высоким разнообразием и хорошей зимостойкостью. На основе этого генофонда Л.А. Крамаренко провела селекционную работу по выведению зимостойких сортов абрикоса, которые были включены в Госреестр селекционных достижений Российской Федерации: Айсберг, Водолей, Гвиани, Лель, Царский и др. Для дальнейшей работы необходимо понимать, в какой степени сорта насыщены каротиноидами, чтобы опираться на эти данные в селекционном отборе. Определено содержание каротиноидов в плодах абрикоса (Prunus armeniaca L., Rosaceae) сортов московской селекции – Айсберг, Водолей, Гвиани, Лель, Царский и Зачатьевский. Задача изучения состояла в использовании различных методик экстракции растительного сырья, способствующих оптимальному извлечению суммы каротиноидов в плодах абрикоса. В качестве экстрагентов использованы гексан, 96%-й этанол при комнатной температуре и этанол в водяной бане при температуре 60 °С (40 мин). Наиболее высокое содержание каротиноидов отмечено у сортов Лель (31,73 мг%) и Водолей (31,77 мг%), наименьшее – у отборного образца Зачатьевский (11,93 мг%). В расчетно-экспериментальных исследованиях использование нескольких растворителей позволяет повысить достоверность определения значений суммы каротиноидов в растительных объектах. Выявленный диапазон содержания каротиноидов может быть использован для характеристики и описания перспективных форм при проведении селекционной работы, направленной на получение новых сортов, обладающих полезными качествами для здоровья.*

Ключевые слова: *Prunus armeniaca, плод, каротиноиды, экстрагент, УФ-спектрофотометрия*

Благодарности. *Авторы благодарны к.б.н. Л.А. Крамаренко, к.фарм.н. Н.С. Цыбулько, О.Л. Ениной за помощь в подготовке эксперимента и оформлении результатов.*

Финансирование. *Работа выполнена по теме «Биологическое разнообразие природной и культурной флоры: фундаментальные и прикладные вопросы изучения и сохранения», номер госрегистрации 122042700002-6 (государственное задание № 075-00745-22-01).*

Для цитирования: Семенова М.В., Куклина А.Г., Кондратьева В.В., Олехнович Л.С., Воронкова Т.В. Содержание каротиноидов в плодах абрикоса *Prunus armeniaca* L. в зависимости от способа извлечения // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 402–408. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-402-408. EDN: HWYQXA.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Carotenoid content in *Prunus armeniaca* L. apricot fruits depending on the extraction method

Maria V. Semenova✉, Alla G. Kuklina, Vera V. Kondratieva, Lyudmila S. Olekhnovich, Tatiana V. Voronkova

N.V. Tsitsin Main Botanical Garden RAS, Moscow, Russian Federation

Abstract. *In the middle of the 20th century, specialists of the Tsitsin Main Moscow Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences collected a valuable apricot gene pool characterized by high diversity and winter hardiness. From this gene pool, L.A. Kramarenko carried out selection work to develop winter-hardy apricot varieties, such as Aisberg, Vodoley, Guiani, Lel', Tsarsky and others, which were included in the State Register of Breeding Achievements of the Russian Federation. The use of these varieties in further selective breeding requires information on their carotenoid content. In this work, we determine carotenoids in apricot (Prunus armeniaca L., Rosaceae) fruits of Moscow breeding varieties Aisberg, Vodoley, Guiani, Lel', Tsarsky and Zachat'ievsky. We employed different extraction*

© Семенова М.В., Куклина А.Г., Кондратьева В.В., Олехнович Л.С., Воронкова Т.В., 2023

methods of plant raw materials, contributing to the optimal extraction of carotenoids from apricot fruits. Extraction was performed with hexane, 96% ethanol at room temperature, and EtOH heated to 60°C (water bath) for 40 min. The highest carotenoid content was observed in Lel' (31.73 mg%) and Vodoley (31.77 mg%) varieties, while the lowest content was observed in the Zachat'ievsky sample (11.93 mg%). The application of multiple solvents increases the reliability of determining carotenoids in plants for computational and experimental studies. The discovered range of their content can be used for description of promising forms during breeding works. In this way, new and beneficial for health varieties may emerge.

Keywords: *Prunus armeniaca, fruit, carotenoids, extractant, UV-spectrophotometry*

Acknowledgements. *The authors are grateful to Cand. Sci. L.A. Kramarenko, Cand. Sci. N.S. Tsybulko and O.L. Enina for their help in preparing the experiment and presenting the results.*

Funding. *The work was carried out on the topic "Biological diversity of natural and cultural flora: fundamental and applied issues of study and conservation", state registration number 122042700002-6 (state task number 075-00745-22-01).*

For citation: Semenova M.V., Kuklina A.G., Kondratieva V.V., Olekhnovich L.S., Voronkova T.V. Carotenoid content in *Prunus armeniaca* L. apricot fruits depending on the extraction method. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(3):402-408. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-402-408. EDN: HWYQXA.

ВВЕДЕНИЕ

Каротиноиды – природные пигменты, синтезируемые в растениях. Они относятся к биологически активным веществам и обладают широким спектром фармакологических свойств. В организме человека каротиноиды повышают иммунитет, оказывают антиоксидантное, ради опротекторное и антиканцерогенное воздействие [1–3].

Плоды абрикоса (*Prunus armeniaca* L., Rosaceae) отличаются питательностью, обогащены жизненно важными природными веществами. Они содержат сахара, включающие глюкозу, фруктозу, мальтозу, рафинозу и сахарозу. В плодах имеются клетчатка, жиры и органические кислоты (яблочная, лимонная, винная, щавелевая, янтарная и малеиновая). Плоды содержат макро- и микроэлементы, в основном калий, фосфор, кальций, магний, в меньшей степени – железо, натрий, цинк, медь, марганец, селен, бор и др. [4–8]. По интенсивности окраски мякоти плодов абрикоса, подобно облепихе и тыкве, можно предполагать о наличии биологически активных веществ – каротиноидов [9–13].

Согласно литературным данным, содержание каротиноидов в плодах абрикоса значительно различается. При анализе гравиметрическим методом в плодах из средней полосы России отмечено 0,7–3,0 мг% каротиноидов [9]. Колориметрический метод определения на абрикосах в Орловской области показал наличие каротиноидов от 1,0 до 3,4 мг/100 г [14]. В сортах, культивируемых в Чехии, наличие каротиноидов варьирует от 0,44 до 1,4 мг/100 г сырого веса [5]. Анализ узбекских сортов показал содержание каротиноидов в пределах 0,7–1,7 мг/100 г; у плодов из Закарпатья – 1,4 мг% [13]. В литературе имеются сообщения о более высоком содержании каротиноидов. Сорта из Испании, анализируемые методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), содержали 0,15–1,65 мг/100 г каротиноидов [15]. Приведенные выше результаты получены без указания методики или формулы расчета либо со ссылкой на другие источники.

В Турции у распространенных сортов абрикоса каротиноиды отмечены в диапазоне от 14,8 до 91,9 мг/100 г абсолютно сухой массы [16]. Согласно выводам А.Г. Курегяна, спектрографическое определение каротиноидов с использованием одного растворителя недостаточно [1].

У абрикоса идентифицированы следующие каротиноиды: антераксантин, лютеин, зеаксантин, *β*-криптоксантин, 13-*цис*-*β*-каротин, транс-*β*-каротин, 9-*цис*-*β*-каротин и др. [11]. На примере плодов из Узбекистана показано, что *β*-каротин составляет до 60%, лютеин – 2,1%, зеаксантин – 0,7% от всей массы каротиноидов [13].

В середине XX века в Москве, в Главном ботаническом саду им. Н.В. Цицина РАН (ГБС РАН), был собран ценный генофонд абрикоса, отличающийся высоким разнообразием и хорошей зимостойкостью. На основе этого генофонда Л.А. Крамаренко [17–19] провела селекционную работу по выведению зимостойких сортов абрикоса, которые были включены в Госреестр селекционных достижений Российской Федерации: Айсберг, Водолей, Гвиани, Лель, Царский и др. Для дальнейшей работы необходимо понимать, в какой степени сорта насыщены каротиноидами, чтобы опираться на эти данные в селекционном отборе.

Цель работы состояла в количественном определении суммы каротиноидов в плодах абрикоса у сортов московской селекции. Задача изучения – сравнение различных методик экстракции растительного сырья, способствующих оптимальному определению суммы каротиноидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования использовали плоды абрикоса обыкновенного (*Prunus armeniaca*), относящиеся к сортам Айсберг, Водолей, Гвиани, Лель, Царский и Зачатьевский. Деревья в возрасте 25 лет произрастают в Москве (ул. Остоженка, на территории Зачатьевского женского монастыря). Образцы отбирали в августе 2022 года, по 20 плодов каждого сорта с деревьев в стадии технической зрелости, когда плоды достигли максимальных размеров, мякоть была плотная. Весь собранный материал очищали от семян и помещали в лабораторный сушильный шкаф ШС-40 (завод «Электродело», Россия) с принудительной конвекцией при температуре 60 °С, высушивая до остаточной влажности не более 20%. Результаты рассчитаны на единицу воздушно-сухой массы.

Экстракция каротиноидов. Для определения суммы каротиноидов в пересчете на *β*-каротин применялась методика[1] [20], модифицированная в лаборатории ГБС РАН. Экстракция растительного сырья проведена различными растворителями при разном температурном режиме. Известно, что каротиноиды растворяются в спирте различной концентрации, гексане, ацетоне и пр.[1,2] [1, 20–22].

1 способ. В качестве экстрагента использовали 95%-й этанол. Навеску высушенного измельченного растительного материала массой 0,2 г растирали в фарфоровой ступке с 3 мл 96%-го этанола. Полученную смесь переносили в пробирку объемом 25 мл, добавляя к остатку в ступке новую порцию экстрагента (2–3 мл), затем доводили до 20 мл кипящим 96%-м этанолом. Пробирку с экстрактом закрывали пробкой и оставляли на 40 мин при комнатной температуре (20–23 °С), периодически встряхивая.

2 способ. В качестве экстрагента также применяли 96%-й этанол. Подготовку проб проводили аналогично способу 1. Пробирки с полученными экстрактами помещали на 40 мин в кипящую водяную баню, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок, закрывали пробкой. Затем образцы охлаждали до комнатной температуры.

В дальнейшем экстракты, полученные 1 и 2 способами, фильтровали в мерные колбы объемом 25 мл через бумажный фильтр (средний широкопористый; Filtrak 389, Германия), смоченный этанолом, доводя до метки.

3 способ. В качестве экстрагента применяли гексан. Навеску высушенного измельченного растительного материала массой 1 г растирали в фарфоровой ступке. Затем полученную смесь с небольшими порциями гексана переносили в мерную колбу объемом 250 мл. Продолжительность экстракции составляла 40 мин при комнатной температуре (20–23 °С). Фильтровали экстракт аналогично предыдущим способам.

УФ-спектрофотометрия. Измерения проводили на спектрофотометре Specol f300 (Analytik Jena, Германия) при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали соответствующие экстрагенты (этанол 95%, гексан).

Содержание каротиноидов вычисляли по следующей формуле[1,2] [20, 23]:

$$X = \frac{D \times V \times 100 \times 10}{a \times k},$$

где X – мг% в пересчете на *β*-каротин; D – оптическая плотность при определенной длине волны, нм; V – объем экстракта, мл; 100 – коэффициент пересчета в мг%; 10 – содержание *β*-каротина в 1 мл; a – масса навески, г; k – удельный показатель поглощения *β*-каротина. Для этанола *k* = 2500, для гексана *k*= 2592 при длине волны 450 нм.

Статистический анализ, выполненный в программе Microsoft Excel и PAST 4.10, позволил провести оценку достоверности полученных значений, коэффициенты корреляции (*r*) и провести визуализацию данных при различных методах извлечения каротиноидов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты, полученные экспериментально с экстрагентами – этанолом и гексаном, отражены на рис. 1. Отмечено, что более низкая экстракционная способность у этанола наблюдается при комнатной температуре. При использовании этанола с нагреванием до 60 °С в течение 40 мин содержание извлеченных пигментов было почти в 2 раза выше. Ранее на примере моркови было показано, что при нагревании этанола растворимость каротиноидов возрастает [24], что согласуется с нашими результатами. Однако если термический процесс длится более 1 ч, то происходит термодеструкция природных каротиноидов [24].

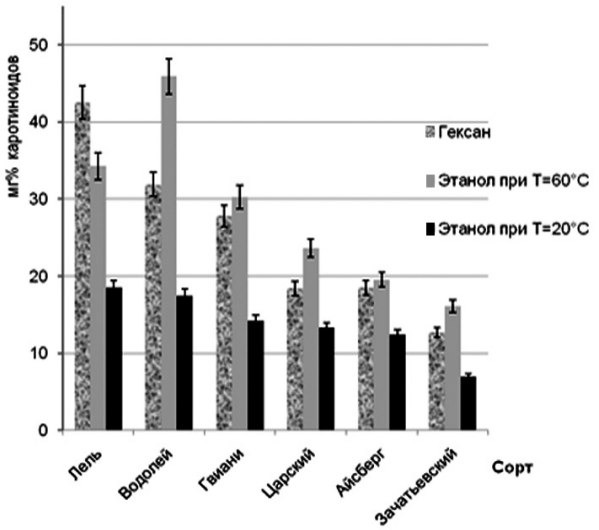


Рис. 1. Содержание каротиноидов в плодах абрикоса при экстракции различными способами (мг% воздушно-сухой массы). Стандартная ошибка: 1 способ – 4,46; 2 способ – 1,68; 3 способ – 4,45

Fig. 1. Carotenoids content in apricot fruits during extraction by various means (mg% air-dry mass). Standard error: 1 way – 4.46; 2 way – 1.68; 3 way – 4.45

По литературным данным содержание в высушенных плодах облепихи при извлечении горячим этанолом составляло от 16 до 55 мг% [20]. Сумма каротиноидов в плодах шиповника при экстракции гексаном варьировала от 10 до 74 мг% в пересчете на абсолютно сухое сырье, используемое для производства масла шиповника [21]. При экстракции гексаном при комнатной температуре содержание каротиноидов в абсолютно сухой массе спирулины составляло 20–40 мг% [22]. Данные анализа каротиноидов для сортов абрикоса в Турции (до 92 мг/100 г абсолютно сухой массы) [16] согласуются с нашими результатами.

[1]Государственная фармакопея РФ. XIV издание. ФС 42-3192-95. Облепиховое масло (Hippophaes oleum) [Электронный ресурс]. URL: https://femb.ru/record/pharmacopea14 (02.03.2023).
[2]Государственная фармакопея РФ. XIV издание. ФС 2.5.01.06.18. Шиповника плоды (Rosae fructus) [Электронный ресурс]. URL: https://femb.ru/record/pharmacopea14 (02.03.2023).

Таким образом, содержание каротиноидов в плодах абрикоса, полученное в итоге нашей работы и составившее в зависимости от сорта и используемого экстрагента от 12 до 32 мг% в пересчете на воздушно-сухую массу, сопоставимо с данными, приводимыми в литературе при использовании методик Государственной фармакопеи РФ[1,2].

В опыте О.В. Тринеевой и А.И. Сливкиной [20] для плодов облепихи наиболее полная экстракция каротиноидов достигается при использовании в качестве растворителя этанола и гексана, что вполне согласуется с полученными результатами. В нашем эксперименте в условиях экстракции гексаном (коэффициент вариации CV=43,2%) и 96%-м этанолом при нагревании в течение 40 мин на водяной бане (CV=38,6%) получены максимальные показатели каротиноидов. В опыте с использованием этанола при комнатной температуре значения суммы каротиноидов меньше (CV=29,7%).

При различных методах извлечения сохраняется зависимость количественного содержания кароти-ноидов от сорта (только у сорта Водолей при нагревании этанола отмечено увеличение содержания каротиноидов). На наш взгляд, оптимальный способ определения суммы каротиноидов в мякоти высушенных плодов абрикосов – экстракция 96%-м этанолом. Этиловый спирт имеет преимущества безопасности по сравнению с гексаном, хотя оба растворителя могут использоваться для экстракции каротиноидов из плодов абрикоса.

Данные наблюдений и результаты эксперимента показывают, что плоды сортов абрикоса можно отнести к ценным каротиносодержащим продуктам. Характеристика сорта Лель: плоды массой до 15,2 г, кожица и мякоть оранжевая. При экстракции тремя способами сумма каротиноидов составляет 31,73±7,04 мг% (CV=38,4%). Сорт Водолей является сеянцем сорта Лель, имеет плоды массой до 13,7 г, желтые, иногда с розовым бочком. Сумма каротиноидов тем же способом составляет 31,77±8,20 мг% (CV=44,7%). Сорт Гвиани: плоды массой 16,6 г, кожица оранжевая с ярко-розовым бочком. Сумма каротиноидов – 24,07±4,98 мг% (CV=35,8%). Сорт Царский: плоды массой до 24 г, желтые с невыраженным румянцем. Сумма каротиноидов – 18,43±2,97 мг% (CV=27,9%). Сорт Айсберг: плоды массой 15,8 г, желтовато-оранжевые. Сумма каротиноидов – 16,80,4±2,22 мг% (CV=22,9%). Сорт Зачатьевский не зарегистрирован в Госреестре РФ. Плоды массой 11,3 г, желто-оранжевые. Сумма каротиноидов – 11,93±2,65 мг% (CV=38,5%).

На рис. 2 проведена визуализация результатов в программе PAST (методом Barchart) для усреднения данных по экстракции тремя использованными способами, отражающими характеристику сортов абрикоса по содержанию каротиноидов.

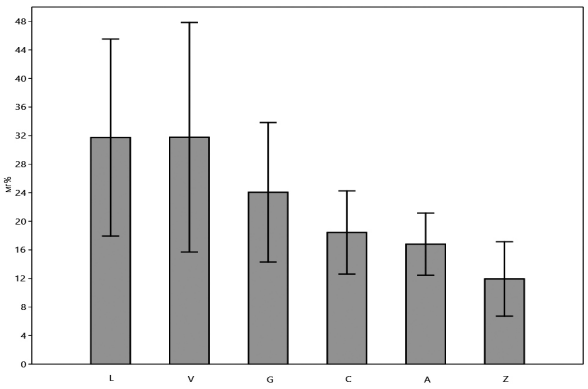


Рис. 2. Визуализация результатов экстракции каротиноидов (мг% воздушно-сухой массы) с использованием трех методов извлечения у сортов Лель (L), Водолей (V), Гвиани (G), Царский (C), Айсберг (A) и Зачатьевский (Z)

Fig. 2. Visualization of carotenoid extraction results (mg% air-dry weight) using three methods extraction in apricot varieties Lel (L), Aquarius (V), Gviani (G), Tsarsky (C), Iceberg (A) and Zachatievsky (Z)

При вычислении коэффициентов корреляции отмечены высокие значения r – от 0,784 до 0,912, показывающие взаимосвязь трех методов извлечения каротиноидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В расчетно-экспериментальных исследованиях использование нескольких растворителей позволяет повысить достоверность определения значений суммы каротиноидов в растительных объектах. При экстракции 96%-м этанолом с нагреванием на водяной бане отмечены максимальные показатели, что указывает на более полное извлечение каротиноидов из плодов абрикоса. В качестве оптимальных способов извлечения каротиноидов можно рекомендовать экстракцию гексаном и этанолом с последующим экстрагированием в течение 40 мин.

Наиболее высокое содержание каротиноидов отмечено у сортов Лель (31,73 мг% воздушно-сухой массы) и Водолей (31,77 мг% воздушно-сухой массы), наименьшее – у отборного образца Зачатьевский (11,93 мг% воздушно-сухой массы). Выявленный диапазон содержания каротиноидов может быть полезен для характеристики и описания перспективных форм при проведении селекционной работы, направленной на получение новых сортов, обладающих полезными качествами для здоровья.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Курегян А.Г. Спектрофотометрия в анализе каротиноидов // Фундаментальные исследования. 2015. N 2. С. 5166–5172. EDN: TWTATZ.

2. Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Роль каротиноидов в профилактике наиболее распространенных заболеваний // Российский биотерапевтический журнал. 2010. Т. 9. N 1. С. 77–86. EDN: QZSLDL.

3. Katayama S., Ogawa H., Nakamura S. Apricot carotenoids possess potent anti-amyloidogenic activity in vitro // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. Vol. 59, no. 23. P. 12691–12696. https://doi.org/10.1021/jf203654c.

4. Ali S., Masud T., Abbasi K.S., Mahmood T., Hussai A. Apricot: nutritional potentials and health benefits – a review // Annals Food Science and Technology. 2015. Vol. 16, no. 1. P. 175–189.

5. Göttingerová M., Kumšta M., Rampáčková E., Kiss T., Nečas T. Analysis of phenolic compounds and some important analytical properties in selected apricot genotypes // HortScience. 2021. Vol. 56, no. 11. P. 1446–1452. https://doi.org/10.21273/HORTSCI16139-21.

6. Lee D.S., Woo S.K., Yang C.B. Studies on the chemical composition of major fruits in Korea-On non-volatile organic acid and sugar contents of apricot (maesil), peach, grape, apple and pear and its seasonal variation // Korean Journal of Food Science and Technology. 1972. Vol. 4, no. 2. P. 134–139.

7. Stryjecka M., Kiełtyka-Dadasiewicz A., Michalak M., Rachoń L., Głowacka A. Chemical composition and antioxidant properties of oils from the seeds of five apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars // Journal of Oleo Science. 2019. Vol. 68, no. 8. P. 729–738. https://doi.org/10.5650/jos.ess19121.

8. Witherspoon J.M., Jackson J.F. Analysis of fresh and dried apricot // Modern Methods of Plant Analysis. 1995. Vol. 18. P. 111–131. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79660-9_7.

9. Акимов М.Ю., Бессонов В.В., Коденцова В.М., Эллер К.И., Вржесинская О.А., Бекетова Н.А. [и др.]. Биологическая ценность плодов и ягод российского производства // Вопросы питания. 2020. Т. 89. N 4. С. 220–232. EDN: UOAQLM. https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10055.

10. Сапарклычева С.Е. Содержание каротина (провитамина А) в растениях и его физиологическая значимость // Аграрное образование и наука. 2021. N 3. С. 4–9. EDN: YXWWAU.

11. Fratianni A., Albanese D., Mignogna R., Cinquanta L., Panfili G., Di Matteo M. Degradation of carotenoids in apricot (*Prunus armeniaca* L.) during process // Plant Foods for Human Nutrition. 2013. Vol. 68. P. 241–246. https://doi.org/10.1007/s11130-013-0369-6.

12. Голубкина Н.А., Химич Г.А., Антошкина М.С., Плотникова У.Д., Надежкин С.М., Коротцева И.Б. Особенности каротиноидного состава тыквы 'Конфетка', перспективы использования // Овощи России. 2021. N 1. С. 111–116. https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-1-111-116.

13. Кудрицкая С.Е. Каротиноиды плодов и ягод. Киев: Высшая школа, 1990. 211 с.

14. Макаркина М.А., Джигадло Е.Н., Павел А.Р., Соколова С.Е., Попкова А.А. Оценка сортов абрикоса по химическому составу плодов, выращенных в условиях средней полосы России // Селекция, генетика и сортовая агротехника плодовых культур. Жилина: Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур, 2013. С. 73–78.

15. Ruiz D., Egea J., Tomás-Barberán F.A., Gil M.I. Carotenoids from new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties and their relationship with flesh and skin color // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005. Vol. 53, no. 16. P. 6368–6374. https://doi.org/10.1021/jf0480703.

16. Akin E.B., Karabulut I., Topcu A. Some compositional properties of main Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties // Food Chemistry. 2008. Vol. 107, no. 2. P. 939–948. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.052.

17. Скворцов А.К., Крамаренко Л.А. Абрикос в Москве и Подмосковье. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. 188 с.

18. Kramarenko L.A. Withstanding of Moscow apricots under extremely low (winter 2006) and extremely high (winter 2006-07) temperatures // Acta Horticulturae. 2010. Vol. 862. P. 453–458. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.862.70.

19. Kramarenko L.A. Formation of the apricot's cultigenous range // Skvortsovia. 2017. Vol. 3, no. 2. P. 72–75.

20. Тринеева О.В., Сливкин А.И. Валидация методики определения каротиноидов в плодах облепихи различных способов консервации // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2016. N 2. С. 145–151.

21. Куркин В.А., Шарова О.В., Афанасьева П.В. Совершенствование методики количественного определения суммы каротиноидов в сырье «Шиповника плоды» // Химия растительного сырья. 2020. N 3. С. 131–138. EDN: WWBCXM. https://doi.org/10.14258/jcprm.2020036093.

22. Первушкин С.В., Куркин В.А., Воронин А.В., Сохина А.А., Шаталаев И.Ф. Методики идентификации различных пигментов и количественного спектрофотометрического определения суммарного содержания каротиноидов и белка в фитомассе *Spirulina platensis* (Nords.) Geilt. // Растительные ресурсы. 2002. Т. 38. N 1. С. 112–119.

23. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods in Enzymology. 1987. Vol. 148. P. 350–382. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1.

24. Болотов В.М., Черепнин В.С., Жеребцов В.А., Киселева Е.В. Химическая модификация природных каротиноидов растительного сырья // Известия вузов. Пищевая технология. 1996. N 1-2. С. 19–22. EDN: QBLHRH.

REFERENCES

1. Kuregyan A.G. The spectrophotometry in analysis of carotenoids. *Fundamental'nye issledovaniya.* 2015;(2):5166-5172. (In Russian). EDN: TWTATZ.

2. Shashkina M.Y., Shashkin P.N., Sergeev A.V. Carotenoids in human health and prevention of diseases. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal = Russian Journal of Biotherapy.* 2010;9(1):77-86. (In Russian). EDN: QZSLDL.

3. Katayama S., Ogawa H., Nakamura S. Apricot carotenoids possess potent anti-amyloidogenic activity in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2011;59(23):12691-12696. https://doi.org/10.1021/jf203654c.

4. Ali S., Masud T., Abbasi K.S., Mahmood T., Hussai A. Apricot: nutritional potentials and health benefits – a review. *Annals Food Science and Technology.* 2015;16(1):175-189.

5. Göttingerová M., Kumšta M., Rampáčková E., Kiss T., Nečas T. Analysis of phenolic compounds and some important analytical properties in selected apricot genotypes. *HortScience.* 2021;56(11):1446-1452. https://doi.org/10.21273/HORTSCI16139-21.

6. Lee D.S., Woo S.K., Yang C.B. Studies on the chemical composition of major fruits in Korea-

On non-volatile organic acid and sugar contents of apricot (maesil), peach, grape, apple and pear and its seasonal variation. *Korean Journal of Food Science and Technology.* 1972;4(2):134-139.

7. Stryjecka M., Kiełtyka-Dadasiewicz A., Michalak M., Rachoń L., Głowacka A. Chemical composition and antioxidant properties of oils from the seeds of five apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars. *Journal of Oleo Science.* 2019;68(8):729-738. https://doi.org/10.5650/jos.ess19121.

8. Witherspoon J.M., Jackson J.F. Analysis of fresh and dried apricot. *Modern Methods of Plant Analysis.* 1995;18:111-131. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79660-9_7.

9. Akimov M.Yu., Bessonov V.V., Kodentsova V.M., Eller K.I., Vrzhesinskaya O.A., Beketova N.A., et al. Biological value of fruits and berries of Russian production. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition.* 2020;89(4):220-232. (In Russian). EDN: UOAQLM. https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10055.

10. Saparklycheva S.E. The content of carotene (provitamin A) in plants and its physiological significance. *Agrarnoe obrazovanie i nauka.* 2021;(3):4-9. (In Russian). EDN: YXWWAU.

11. Fratianni A., Albanese D., Mignogna R., Cinquanta L., Panfili G., Di Matteo M. Degradation of carotenoids in apricot (*Prunus armeniaca* L.) during process. *Plant Foods for Human Nutrition.* 2013;68:241-246. https://doi.org/10.1007/s11130-013-0369-6.

12. Golubkina N.A., Khimich G.A., Antoshkina M.S., Plotnikova U.D., Nadezhkin S.M., Korottseva I.B. Features of the carotenoid composition of pumpkin 'Konfetka', prospects for use. *Ovoshchi Rossii = Vegetable crops of Russia.* 2021;(1):111-116. (In Russian). https://doi.org/10.18619/2072-9146-2021-1-111-116.

13. Kudritskaya S.E. *Carotenoids of fruits and berries*. Kiev: Vysshaya shkola, 1990. 211 p. (In Russian).

14. Makarkina M.A., Dzhigadlo E.N., Pavel A.R., Sokolova S.E., Popkova A.A. Evaluation of apricot varieties by the chemical composition of fruits grown in the conditions of central Russia. In: *Breeding, genetics and varietal agricultural technology of fruit crops*. Zhilina: Vserossiiskii nauchno-issledovatel'skii institut selektsii plodovykh kul'tur; 2013, p. 73-78. (In Russian).

15. Ruiz D., Egea J., Tomás-Barberán F.A., Gil M.I. Carotenoids from new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties and their relationship with flesh and skin color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005;53(16):6368-6374. https://doi.org/10.1021/jf0480703.

16. Akin E.B., Karabulut I., Topcu A. Some compositional properties of main Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Food Chemistry.* 2008;107(2):939-948. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.052.

17. Skvortsov A.K., Kramarenko L.A. *Apricot in Moscow and Moscow region*. Moscow: Tovarishchestvo nauchnykh izdanii KMK; 2007, 188 p. (In Russian).

18. Kramarenko L.A. Withstanding of Moscow apricots under extremely low (winter 2006) and extremely high (winter 2006-07) temperatures. *Acta Horticulturae.* 2010;862:453-458. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.862.70.

19. Kramarenko L.A. Formation of the apricot's cultigenous range. *Skvortsovia.* 2017;3(2):72-75.

20. Trineeva O.V., Slivkin A.I. Validation of the method for determining carotenoids in sea buckthorn fruits of various preservation methods. *Vestnik VGU. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy.* 2016;(2):145-151. (In Russian).

21. Kurkin V.A., Sharova O.V., Afanaseva P.V. Improving the method of quantitative determination of the amount of carotenoids in the raw material "Rosehip fruit". *Khimiya rastitel'nogo syr'ya.* 2020;(3):131-138. (In Russian). EDN: WWBCXM. https://doi.org/10.14258/jcprm.2020036093.

22. Pervushkin S.V., Kurkin V.A., Voronin A.V., Sokhina A.A., Shatalaev I.F. Methods for identification of various pigments and quantitative spectrophotometric determination of the total content of carotenoids and protein in the phytomass of *Spirulina platensis* (Nords.) Geilt. *Rastitel'nye resursy.* 2002;38(1):112-119. (In Russian).

23. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology.* 1987;148:350-382. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1.

24. Bolotov V.M., Cherepnin V.S., Zherebtsov V.A., Kiseleva E.V. Chemical modification of natural carotenoids of vegetable raw materials. *Izvestiya vuzov. Pishchevaya tekhnologiya = Izvestiya Vuzov. Food Technology.* 1996;(1-2):19-22. (In Russian). EDN: QBLHRH.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Семенова Мария Владимировна,
к.б.н., научный сотрудник,
Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН,
127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 4,
Российская Федерация,
✉sem_ma@mail.ru
https://orcid.org/ 0000-0002-4627-0802

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Maria V. Semenova,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
N.V. Tsitsin Main Botanical Garden RAS,
4, Botanic St., Moscow, 127276,
Russian Federation,
✉sem_ma@mail.ru
https://orcid.org/ 0000-0002-4627-0802

Куклина Алла Георгиевна,
к.б.н., ведущий научный сотрудник,
Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН,
127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 4,
Российская Федерация,
alla_gbsad@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-9783-7776

Кондратьева Вера Валентиновна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН,
127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 4,
Российская Федерация,
verbena_20@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-3934-9288

Олехнович Людмила Сергеевна,
младший научный сотрудник,
Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН,
127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 4,
Российская Федерация,
mila.oleh@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-3230-0038

Воронкова Татьяна Владимировна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН,
127276, г. Москва, ул. Ботаническая, 4,
Российская Федерация,
winterness@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-6112-271X

Alla G. Kuklina,
Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher,
N.V. Tsitsin Main Botanical Garden RAS,
4, Botanic St., Moscow, 127276,
Russian Federation,
alla_gbsad@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-9783-7776

Vera V. Kondratieva,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
N.V. Tsitsin Main Botanical Garden RAS,
4, Botanic St., Moscow, 127276,
Russian Federation,
verbena_20@mail.ru
https://orcid.org/0000-003-3932-9288

Lydmila S. Olekhnovich,
Junior Researcher,
N.V. Tsitsin Main Botanical Garden RAS,
4, Botanic St., Moscow, 127276,
Russian Federation,
mila.oleh@mail.ru
https://orcid.org/0000-002-3230-0038

Tatiana V. Voronkova,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
N.V. Tsitsin Main Botanical Garden RAS,
4, Botanic St., Moscow, 127276,
Russian Federation,
winterness@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-6112-271X

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.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

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.

Информация о статье

Поступила в редакцию 27.03.2023.
Одобрена после рецензирования 28.06.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

Information about the article

The article was submitted 27.03.2023.
Approved after reviewing 28.06.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Обзорная статья
УДК 581.143.6:604.4
EDN: DAARPC
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-409-415

Культура клеток *Scorzonera hispanica* L., штамм СФР-SH1. Основные вторичные метаболиты

А.А. Семёнов, А.Г. Еникеев✉

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

Аннотация. *Культуры клеток растений широко используются в мировой фармацевтической промышленности в качестве сырья для получения биологически активных соединений. Развитию этого направления биотехнологии способствуют определенные преимущества, включая независимость от сезонных условий, болезней и их переносчиков, возможность получить необходимое количество требуемого продукта, обладающего стандартными качественными характеристиками. Еще одним преимуществом метода является возможность получения в силу особенностей биологии культур клеток новых соединений, биосинтез которых в интактном растении не происходит. Представлен обзор результатов исследований вторичных метаболитов, выделенных из культуры клеток Scorzonera hispanica L., штамм СФР-SH1 – источника биомассы, обладающей биологической активностью. Кратко представлена история изучаемого штамма. Описаны схемы выделения и очистки вторичных метаболитов. Обнаруженные в клетках основные вторичные метаболиты условно разделены на три группы. В первую включены соединения, характерные для большинства растений: β-ситостерин и его глюкозид, метиловый эфир кофейной кислоты, олеановая кислота. Ко второй группе отнесены соединения, сравнительно редко встречаемые в растительных объектах: моноглюкозид сирингарезинола. В третью группу включены два соединения, впервые выделенные из природных объектов: сесквитерпеновый глюкозид, скорзозид и неолигнан скорзонозид. Проведен сравнительный анализ полученных результатов с имеющимися в настоящее время в научной литературе данными по химическому составу нативных растений S. hispanica и некоторых других представителей рода Scorzonera. Из обнаруженных в культивируемых клетках химических соединений наибольший практический интерес представляет моногликозид сирингарезинола – вещество, обладающее высокой биологической активностью. Описаны изменения по неустановленной причине физико-химических характеристик этого соединения в процессе длительного культивирования.*

Ключевые слова: *Scorzonera hispanica L., культура клеток, вторичные метаболиты*

Для цитирования: Семёнов А.А., Еникеев А.Г. Культура клеток *Scorzonera hispanica* L., штамм СФР-SH1. Основные вторичные метаболиты // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 409–415. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-409-415. EDN: DAARPC.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Review article

Cell culture of *Scorzonera hispanica* L., strain SFR-SH1. Major secondary metabolites

Arkadiy A. Semenov, Andrey G. Enikeev✉

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

Abstract. *Plant cell cultures are widely used in the world pharmaceutical industry as a raw material for the production of biologically active compounds. Their certain advantages, such as independence from seasonal conditions, diseases and their transmitter, contribute to the development of this area of biotechnology. In addition, it is possible to obtain the required quantity of the desired product with standard quality characteristics. Since the biosynthesis of new compounds does not occur in the intact plant, another advantage of this method arises. It consists in obtaining new substances due to the peculiarities of cell culture biology. The conducted review represents secondary metabolites isolated from the cell culture of Scorzonera hispanica L., strain SFR-SH1, possessing biological activity. In addition, the history of developing the selected strain and schemes for isolation and purification of secondary metabolites are demonstrated. For a clearer discussion, the main secondary metabolites found in cells are broadly divided into three groups. The first group includes compounds typical of most plants: β-sitosterol and its glucoside, caffeic acid methyl ester and oleanic acid. The second group contains syringaresinol monoglucoside, which is relatively rare in plant objects. The third group includes two compounds isolated from natural objects for the first time: sesquiterpene*

© Семёнов А.А., Еникеев А.Г., 2023

glucoside, scorzoside and neolignan scorzonoside. The results obtained were compared with the available literature data on the chemical composition of native plants of S. hispanica and other Scorzonera genera species. Due to its high biological activity, Syringaresinol monoglycoside attracts more attention than other compounds detected in cultured cells. Long-term cultivation of Monoglycoside leads to an alteration in the physicochemical characteristics of this compound for an unknown reason.

Keywords: *Scorzonera hispanica L., cell culture, secondary metabolites*

For citation: Semenov A.A., Enikeev A.G. Cell culture of *Scorzonera hispanica* L., strain SFR-SH1. Major secondary metabolites. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(3):409-415. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-409-415. EDN: DAARPC.

ВВЕДЕНИЕ

Общая тенденция развития фарминдустрии состоит в дальнейшем внедрении в лечебную практику лекарственных средств, получаемых на основе природных соединений, преимущественно растительного происхождения, или их модификаций [1–3]. Лимитирующим звеном использования лекарственных растений в фармацевтическом производстве часто является ограниченная сырьевая база, исключающая возможность сбора растений в дикой природе. Задача может быть успешно решена с помощью методов культур тканей и изолированных органов. В настоящее время биотехнологические методы получения субстанций для производства лекарств широко применяются в мировой фармацевтической промышленности [4, 5]. Дополнительные возможности для создания новых лекарств открываются вследствие наличия у отдельных штаммов биосинтеза биологически активных соединений, отсутствующих в интактном растении [6].

Цель настоящего обзора – обобщение результатов исследований культуры клеток *Scorzonera hispanica* L., штамм СФР-SH1 (продуцент биологически активных соединений), проводившихся в течение более четырех десятилетий в институтах СО РАН.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культура клеток козельца испанского. Растение *Scorzonera hispanica* L. (козелец испанский) семейства Asteraceae (Сложноцветные) широко распространено в умеренной зоне Евразии. Во многих странах Европы его корень используется как овощная культура, богатая инулином и другими несахарными полисахаридами. Растение также считается лекарственным [7]. Исходная культура клеток *S. hispanica* была получена из корончато-галловой опухоли листа в средине 50-х годов прошлого века во Франции. В 1968 году предоставлена в Институт экспериментальной ботаники АН ЧССР (Прага), откуда в 1972 году передана в лабораторию биохимии фитогормонов Сибирского института физиологии и биохимии растений СО АН СССР (г. Иркутск). В 1973 году Л.М. Ошаровой и К.З. Гамбургом впервые была получена суспензионная культура и выделен новый штамм – СФР-SH1 (ВСКК-ВР №35). В 1991 году штамм депонирован во Всесоюзной коллекции культур клеток высших растений (ИФР РАН, г. Москва). Установлено, что клеточная масса обладает биологической активностью [8]. Изучение состава вторичных метаболитов в культивируемых клетках проведено

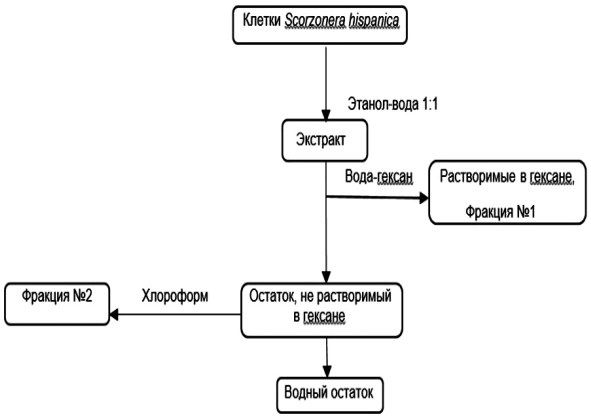


Рис. 1. Выделение фракций вторичных метаболитов культуры клеток *S. hispanica*

Fig. 1. Isolation of fractions of secondary metabolites of *S. hispanica* cell culture

в лаборатории природных соединений Иркутского института химии СО РАН.

Выделение и идентификация вторичных метаболитов из культивируемых клеток. В связи с наличием биологической активности биомассы штамма и перспективами его биотехнологического использования встал вопрос об идентификации обусловливающих эту активность соединений. Для выделения вторичных метаболитов клеточную массу освобождали от культуральной среды фильтрованием и исчерпывающе экстрагировали смесью этанол–вода (1:1). Полученный экстракт концентрировали до небольшого объема на роторном испарителе и фракционировали растворителями с возрастающей полярностью по схеме, представленной на рис. 1. Однако применение этой схемы показало, что значительное число вторичных метаболитов, в том числе биологически активных, имеет гидрофильный характер и остается в водном остатке. Поэтому использована дополнительная процедура с применением экстрактора непрерывного действия и жидкость-жидкостной хроматографии (рис. 2). Для выделения индивидуальных веществ послужили фракции №1 и 2 (см. рис. 1) и фракции №3–5 (см. рис. 2). Эти фракции подвергали дальнейшему фракционированию методами колоночной хроматографии (КХ), препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ) и жидкость-жидкостной хроматографии (ЖЖХ). В результате этого основные вторичные метаболиты клеток *S. hispanica* были выделены в чистом виде. Химическая структура исследуемых соединений установлена методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР), ИК-спектроскопии (ИК), хромато-масс-спектроскопии (МС), УФ-спектроскопии (УФ).

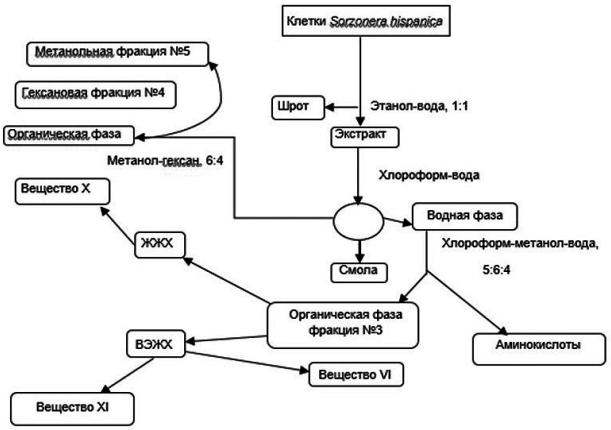


Рис. 2. Разделение гидрофильных вторичных метаболитов клеток *S. hispanica*

Fig. 2. Separation of hydrophilic secondary metabolites of *S. hispanica* cells

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основные вторичные метаболиты культуры клеток Scorzonera hispanica. Основные вторичные метаболиты, обнаруженные в культивируемых клетках, представлены на рис. 3. Из фракции №1 (см. рис. 1) с помощью КХ на силикагеле гексаном и смесями гексан–бензол выделили сумму стеринов, которую анализировали методом МС. Использован масс-спектрометр LKB-2091 (LKB, Швеция), снабженный капиллярной колонкой с фазой SE-30 в изотермическом режиме. Отдельные компоненты смеси идентифицировались по их молекулярным ионам и пикам с m/z $[M-85]^+$ и $[M-111]^+$, характеристичным для Δ5 стеринов. При этом установлено, что основным компонентом смеси является β-ситостерин (I) (см. рис. 3). Кроме того, в ней содержатся кампестерин (M^+ 400) и стигмастерин (M^+ 412).

Колоночной хроматографией на силикагеле из фракции №2 (см. рис. 1) путем элюирования смесями бензола и ацетона выделено кристаллическое вещество с т.пл. 266–268° (из метанола-хлороформа). С помощью ЯМР-спектроскопии ^{13}C и сравнением с аутентичной пробой оно идентифицировано как *β*-D-глюкопиранозид *β*-ситостерина (**II**) (см. рис. 3) [9].

Фракция «водный остаток» (см. рис. 1) подвергнута КХ на колонке с полиамидом в системе вода–метанол с увеличивающимся содержанием метанола. Фракцию, обогащенную индивидуальными компонентами по данным тонкослойной хроматографии, рехроматографировали на колонках с силикагелем. При этом выделили вещества **III** и **IV** (см. рис. 3). По данным ЯМР, ИК и МС первое соединение идентифицировано как кофейная кислота (**III**) [10]. Вещество IV, $C_{10}H_{10}O_4$, т.пл. 159–160°, M^+ 194 идентифицировано как метиловый эфир кофейной кислоты (см. рис. 3). Ранее сложный эфир IV был найден во многих растениях, например, в хвоще полевом [10].

Из фракций №1 и 2 (см. рис. 1) хроматографией на силикагеле в системе растворителей бензол–ацетон выделено белое кристаллическое вещество состава $C_{30}H_{48}O_3$ с молекулярной массой 456. По данным ИК-спектроскопии оно содержало карбоксильную группу. С помощью эфирного раствора диазометана оно было превращено в метиловый эфир, который по всем физическим свойствам и спектральным данным идентичен метиловому эфиру олеаноловой кислоты (**V**) (см. рис. 3) [11].

По дополнительной схеме (см. рис. 2) также выделено ранее неизвестное белое кристаллическое вещество, названное скорзонозидом [12]. Его структура и стереохимия как глюкозида сесквитерпеенового лактона VI установлена комбинацией физико-химических методов (см. рис. 3). Несколько аналогичных гваяновых сесквитерпеноидов обнаружено в клетках близкородственного вида *S. divaricata* [13].

Из фракций №3 и 5 (см. рис. 2) методом противоточной капельной хроматографии в системе растворителей хлороформ–метанол–вода (5:6:4) выделено бесцветное кристаллическое вещество состава $C_{28}H_{36}O_{13}$ с т. пл. 177–179°, $[\alpha]_{546}^{25}$ -7° и молекулярной массой 580 (FAB-масс-спектрометрия). Совокупность физико-химических методов (ИК, УФ, МС, ЯМР) позволила установить структуру моноглюкозида сирингарезинола (МГСР) (VII) (см. рис. 3) [14] – соединения, обусловливающего основной спектр биологической активности клеточной массы [15].

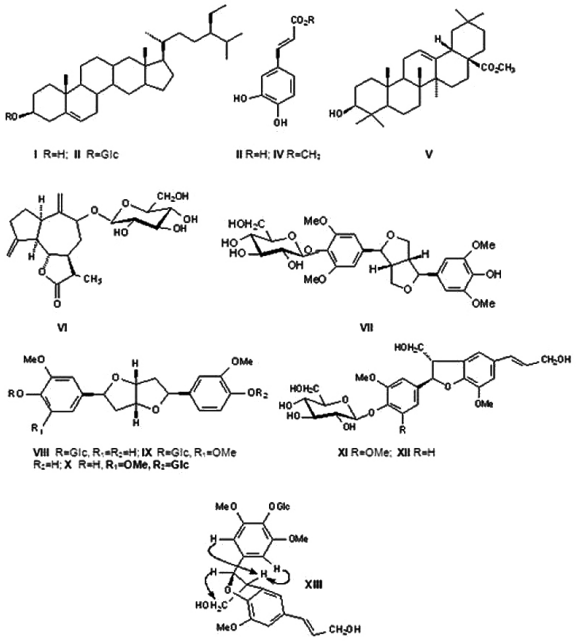


Рис. 3. Вторичные метаболиты культуры клеток *S. hispanica*

Fig. 3. Secondary metabolites of *S. hispanica* cell culture

Моноглюкозид сирингарезинола является основным лигнаном, продуцируемым клетками *S. hispanica*. Его содержание в сырой биомассе составляет в среднем 4×10^{-2}%. Кроме МГСР, в культуре клеток отмечен биосинтез его минорных аналогов. Их содержание в биомассе не превышает 10^{-4}%. Тем не менее удалось получить фракцию минорных фурофурановых лигнанов и разделить ее на три индивидуальных вещества с помощью препаративной ВЭЖХ. Установление строения их проведено на основании данных УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии [16].

Соединения **VIII** и **IX** представляют собой ранее описанные 4"-*β*-D-глюкопиранозиды пинорезинола и медиорезинола, а соединением **X** является

4"-*β*-D-глюкопиранозидом медиорезинола (см. рис. 3) [17, 18].

Кроме производных диарилбензофурана, среди минорных метаболитов найдены неолигнаны бензофуранового ряда [19, 20]. Они отделены от сопутствующего моноглюкозида сирингарезинола и разделены на два индивидуальных вещества комбинацией методов хроматографии. Их структура и стереохимия установлены с помощью методов двумерной ЯМР-спектроскопии как 4-*β*-D-глюкопиранозидов 5-метокси-дегидродикониферилового спирта (скорзозид, **XI**, ранее неизвестное соединение) и дигидродикониферилового спирта **XII** (см. рис. 3). На формуле **XIII** (см. рис. 3) стрелками показаны чрезпространственные взаимодействия, выявленные при анализе спектра ROESY. Этим устранены разночтения относительно стереохимии арилфурановых неолигнанов, имеющиеся в литературе [21]. Интересно отметить, что выявленный из клеток лигнановый комплекс по компонентному составу близок к набору лигнанов широко известного в восточной медицине тонизирующего растения *Eucommia ulmoides* [22] и адаптогенного экстракта элеутерококка [23].

Моноглюкозид сирингарезинола и его аналоги. Сирингарезинол и его производные в природе существуют в виде нескольких стереоизомеров и их смесей. Культура клеток *S. hispanica* продуцирует только один стереоизомер МГСР, что следует из особенностей спектров ЯМР. Расшифровка спектров показала полную симметричность молекулы агликона, что возможно только при цис-сочленении тетрагидрофурановых колец и дипсевдоэкваториальном расположении ароматических заместителей [24]. При кислотном гидролизе глюкозида образуется смесь стереоизомерных агликонов. В аморфном виде это вещество находили и в других растениях [25].

Клетки *S. hispanica* культивируются в течение многих десятков лет, и эта культура считается весьма стабильной. Еще в 1992 году авторы выделили из нее МГСР [14]. С тех пор это вещество неоднократно выделялось из этих клеток и использовалось в экспериментах по исследованию его биологической активности. Оно было достаточно хорошо охарактеризовано химически: $C_{28}H_{36}O_{13}$, т.пл. 177–179°, $[\alpha]_{546}^{25}$ -7°, молекулярная масса 580 (FAB-масс-спектрометрия), ЯМР-спектроскопия и др. Однако в 2014 году при попытке выделить МГСР вместо кристаллического вещества был получен аморфный продукт, по многим свойствам напоминающий желаемый лигнан. Он имел то же время удерживания и спектральные соотношения на ВЭЖХ, те же спектры ЯМР. Это исключало вещества других относительных конфигураций, биосинтез которых возможен в ряду фурофурановых лигнанов. Продукция этого аморфного вещества клетками *S. hispanica* продолжается до сих пор. Важно, что другие авторы, выделявшие лигнан МГСР из растений, описывали его как аморфное вещество [26, 27], что контрастирует с приведенными выше характеристиками как кристаллического продукта. Так как все спектральные данные обеих форм идентичны, то можно предположить, что аморфная форма является псевдорацематом или конгломератом диастереомеров. Подтверждение этого имеет значение, помимо прочего, и для выяснения противоречивых данных о биологических свойствах МГСР, т.к. энантиомеры и диастереомеры могут сильно отличаться друг от друга по этим свойствам. Причины изменения свойств указанного соединения не установлены и могут стать предметом самостоятельного исследования.

Сравнение состава вторичных метаболитов культуры клеток и нативных растений Scorzonera hispanica. Химический состав *S. hispanica* изучался преимущественно с позиций пищевой ценности этого растения как источника инулина в корнях [28, 29]. Авторам известно лишь несколько фитохимических исследований, посвященных изучению вторичных метаболитов надземной части растения. В листьях растения найдены многие обычные для растительного метаболизма вещества. Речь идет о таких соединениях, как *β*-ситостерин, тритерпеноиды амиринового ряда, например, α-амирин и его О-ацильные производные, хлорогеновая кислота и ацилированная хинная кислота, флавоноиды и фенолокислоты [7, 30, 31]. Эти общие для многих растений вещества присутствуют как в нативном растении, так и в культуре клеток (рис. 4).

Функции вторичных метаболитов в культурах клеток отличаются от таковых в растении. Клетки в изолированной культуре могут утрачивать способность к биосинтезу отдельных метаболитов, в то же время активируется биосинтез соединений, отсутствующих в нативном растении [32]. Поэтому в исследованном штамме не найдено тритерпенов и флавоноидов, а в надземной части растения не обнаружены лигнаны и неолигнаны.

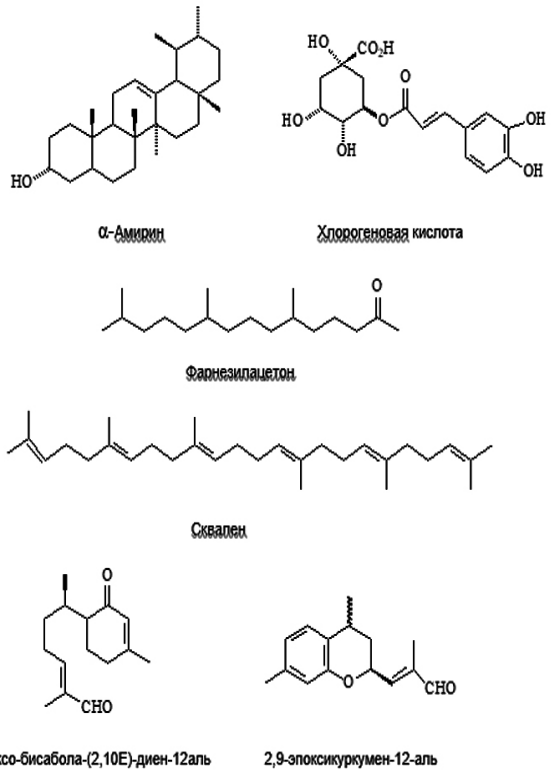


Рис. 4. Вторичные метаболиты надземной части растения *S. hispanica*

Fig. 4. Secondary metabolites of the aboveground part of the *S. hispanica* plant

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты анализа состава вторичных метаболитов в культуре клеток *S. hispanica* выявили отличия с таковым от нативного растения. Описан ряд редких и новых, ранее неизвестных соединений, обладающих биологической активностью. Полученные данные позволяют рассматривать биомассу исследованного штамма в качестве источника биологически активных соединений, перспективных для создания новых лекарственных препаратов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Shakya A.K. Medicinal plants: future source of new drugs // International Journal of Herbal Medicine. 2016. Vol. 4, no. 4. P. 59–64. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1395.6085 .

2. Seca A.M.L., Pinto D.C.G.A. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application // International Journal Molecular Science. 2018. Vol. 19, no. 1. P. 263. https://doi.org/10.3390/ijms19010263 .

3. Majolo F., Delwing L.K.O.B., Marmitt D.J., Bustamante-Fiho I.C., Goettert M. Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: important advances for drug discovery // Phytochemistry Letters. 2019. Vol. 31. P. 196–207. https://doi:org/10.1016/j.phytol.2019.04.003.

4. Dias M.I., Sousa J.S., Alves R.C., Ferreira C.F.R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: a review // Industrial Crops and Products. 2016. Vol. 82. P. 9–22. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016.

5. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures // Engineering. 2019. Vol. 5, no. 1. P. 50–59. https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006.

6. Bhojwani S.S., Razdan M.K. Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition. Amsterdam: Elsevier, 1996. 767 p.

7. Сампиев А.М., Хочава М.Р., Онбыш Т.Е., Шевченко А.И., Быкова О.А., Хазиева Ф.М. Современное состояние и перспективы дальнейшего исследования скорцонеры испанской (обзор) // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020. Т. 23. N 1. С. 3–8. EDN: SWKBKW. https://doi.org/10/29296/25877313-2020-01-01.

8. Пат. N 2059718, Российская Федерация, C12N 5/00, A01H 4/00. Штамм *Scorconera hispanica* ВСКК-ВР№35 – источник растительной биомассы, обладающей биологической активностью / К.З. Гамбург, Л.М. Ошарова, Е.Ф. Высоцкая, А.Г. Еникеев; заявитель и патентообладатель АО «Промет». Заявл. 05.06.1992; опубл. 05.10.1996.

9. Громова А.С., Тукало Е.А., Ганенко Т.В., Луцкий В.И., Витковский В.Ю. Гликозид (5)-ситостерина из *Aconitum czekanovskyi* Steinb., *Thalictrum foetidum* L., *Th. squarrosum* Stefti., Th. Minus // Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия химических наук. 1986. N 3. С. 83–85.

10. Сырчина А.И., Семенов А.А., Тюкавкина Н.А., Витковский В.Ю., Воронков М.Г. Метиловые эфиры фенолокислот из *Equisetum arvense* // Химия природных соединений. 1981. N 5. С. 658.

11. Ogunkoy L. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes // Phytochemistry. 1981. Vol. 20, no. 1. P. 121–126. https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85230-2.

12. Брянский О.В., Толстихина В.В., Семенов А.А. Сесквитерпеновый глюкозид из культивируемых клеток *Scorzonera hispanica* // Химия природных соединений. 1992. N 6. С. 640–645.

13. Yang Y.-J., Yao J., Jin X.-J., Shi Z.-N., Shen T.-F., Fang J.-G., et al. Sesquiterpenoids and tirucallane triterpenoids from roots of *Scorzonera divaricate* // Phytochemistry. 2016. Vol. 124. P. 86–98. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.015.

14. Брянский О.В., Толстихина В.В., Семенов А.А. Глюкозид сирингорезинола из культуры клеток *Scorzonera hispanica* // Химия природных соединений. 1992. N 5. С. 591–592.

15. Semenov A.A., Enikeev A.G., Khobrakova V.B., Razuvayeva Y.G., Nikolayev S.M. Study on the healing effect of syringaresinol β-D-monoglucoside // International Journal of Biomedicine. 2013. Vol. 3, no. 4. P. 287–290. EDN: RPWEZV.

16. Agrawal P.K., Rastogi R.O., Osterdahl B.G. ^{13}C NMR spectral analysis of dihydrobenzofuran lignans // Organic Magnetic Resonance. 1983. Vol. 21, no. 2. P. 119–121. https://doi.org/10.1002/omr.1270210208.

17. Agrawal P.K., Thakur R.S. ^{13}C NMR spectroscopy of lignans and neolignans // Magnetic Resonance in Chemistry. 1985. Vol. 23, no. 6. P. 389–418. http://doi.org/10.1992/mrc.1260230602.

18. Salama O., Chandhuri R.K., Sticher O.A. A lignan glucoside from *Euphrasia rostkoviana* // Phytochemistry. 1981. Vol. 20, no. 11. P. 2603–2604. https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)83110-X.

19. Толстихина В.В., Семенов А.А. Минорные метаболиты культуры клеток *Scorzonera hispanica* // Растительные ресурсы. 1998. Т. 34. N 2. С. 77–80.

20. Толстихина В.В., Семенов А.А. Минорные лигнаны из культивируемых клеток *Scorzonera hispanica* // Растительные ресурсы. 1999. Т. 35. N 1. С. 87–89.

21. Lundgren L.N., Popoff T., Theander O. Dilignol glycosides from needles of *Picea abies* // Phytochemistry. 1981. Vol. 20, no. 8. P. 1967–1969. https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)84046-0.

22. Oshima Y., Takuta S., Hikino H., Deyama T., Rinoshita G. Anticomplementary activity of the constituents of *Eucommia ulmoides* bark // Journal of Ethnopharmacology. 1988. Vol. 23, no. 2-3. P. 159–164. https://doi.org/10.1016/0378-8741(88)90003-7.

23. Оводов Ю.С., Фролова Г.М., Нефедова М.Ю., Еляков Г.Б. Гликозиды *Eleutherococcus senticosus*. II. Строение элеутерозидов A, B, C, D // Химия природных соединений. 1967. N 1. С. 63–64.

24. Pelter A., Ward R.S., Watson D.J., Jack I.R. Synthesis and N.M.R. spectra of 2,6- and 2,4-diaryl-3,7-dioxabicyclo-(3.3.0) octanes // Journal of the Chemical Society. Perkin Transaction 1. 1982. Vol. 1. P. 183–190. https://doi.org/10.1039/P19820000183.

25. Priyashree S., Jha S., Pattanayak S.P. A review on *Cressa cretica* Linn.: a halophytic plant // Pharmacognosy Review. 2010. Vol. 4, no. 8. P. 161–166. https://doi.org/10.4103/0973-7847.70910.

26. Lami N., Kadota Sh., Kikuchi T., Momose Y. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. III. Identification of Ca^{2+} channel antagonistic compound from the methanol extract // Chemical Pharmaceutical Bulletin.

1991. Vol. 39, no. 6. P. 1551–1555.
https://doi.org/10.1248/cpb.39.1551.

27. Nakamura S., Zhang Y., Matsuda H., Ninomiya K., Muraoka O., Yoshikawa M. Chemical structure and hepatoprotective effects of constituents from leaves of *Salacia chinensis* // Chemical Pharmaceutical Bulletin. 2011. Vol. 59, no. 8. P. 1020–1028.
https://doi.org/10.1248/cpb.59.1020.

28. Головкин Б.Н., Руденская Р.Н., Трофимова И.А., Шретер А.И. Биологически активные вещества растительного происхождения: монография. М.: Наука, 2001. 764 с.

29. Маршалкин М.Ф., Оробинская В.Н. Пищевые волокна скорцонера и овсяного корня и их лечебно-профилактическое использование // Успехи современного естествознания. 2002. N 2. С. 77–84. EDN: TFYDQH.

30. Сампиев А.М., Шевченко А.И., Хочава М.Р., Никифорова Е.Б., Быкова О.А. Исследование флавоноидов, фенолкарбоновых и органических кислот скорцонеры испанской (Scorzonera hispanica L.) // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018. Т. 21. N 1. С. 25–29.
https://doi.org/10.29296/25877313-2018-01-05. EDN: YPUTYY.

31. Granica S., Lohwasser U., Jöhrer K., Zidorn C. Qualitative and quantitative analyses of secondary metabolites in aerial and subaerial of Scorzonera hispanica L. (black salsify) // Food Chemistry. 2015. Vol. 173. P. 321–331.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.006.

32. Носов А.М. Функции вторичных метаболитов растений in vivo и in vitro // Физиология растений. 1994. Т. 41. N 6. С. 873–878.

REFERENCES

1. Shakya A.K. Medicinal plants: future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine.* 2016;4(4):59-64.
https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1395.6085.

2. Seca A.M.L., Pinto D.C.G.A. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *International Journal Molecular Science*. 2018;19(1):263.
https://doi.org/10.3390/ijms19010263.

3. Majolo F., Delwing L.K.O.B., Marmitt D.J., Bustamante-Fiho I.C., Goettert M. Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: important advances for drug discovery. *Phytochemistry Letters*. 2019;31:196-207.
https://doi:org/10.1016/j.phytol.2019.04.003.

4. Dias M.I., Sousa J.S., Alves R.C., Ferreira C.F.R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: a review. *Industrial Crops and Products*. 2016;82:9-22.
https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016.

5. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*. 2019;5(1):50-59.
https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006.

6. Bhojwani S.S., Razdan M.K. *Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition.* Amsterdam: Elsevier; 1996. 767 p.

7. Sampiev A.M., Khochava M.R., Onbysh T.E., Shevchenko A.I., Bykova O.A., Khazieva F.M. Current status and the perspectives of follow-up study of Spanish salsify (survey). *Voprosy biologicheskoj, medicinskoj i farmacevticheskoj himii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry.* 2020;23(1):3-8. (In Russian). EDN: SWKBKW.
https://doi.org/10/29296/25877313-2020-01-01.

8. Gamburg K.Z., Osharova L.M., Vysotskaja E.F., Enikeev A.G. *Strain of Scorzonera hispanica – a source of vegetable biomass showing biological activity.* Patent RF, no. 2059718; 1996. (In Russian).

9. Gromova A.S., Tukalo E.A., Ganenko T.V., Luckij V.I., Vitkovskij V.Ju. Glycoside (5)-sitosterol from *Aconitum czekanovskyi* Steinb., *Thalictrum foetidum* L., *Th. squarrosum* Stefti., Th. Minus. *Izvestija Sibirskogo otdelenija Akademii nauk SSSR. Serija himicheskih nauk*. 1986;(3):83-85. (In Russian).

10. Syrchina A.I., Semenov A.A., Tjukavkina N.A., Vitkovskij V.Ju., Voronkov M.G. Methyl esters of phenolic acids from *Equisetum arvense. Himija prirodnyh soedinenij = Chemistry of Natural Compounds.* 1981;(5):658. (In Russian).

11. Ogunkoy L. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. *Phytochemistry.* 1981;20(1):121-126.
https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85230-2.

12. Brjanskij O.V., Tolstihina V.V., Semenov A.A. Sesquiterpene glucoside from cultured cells of *Scorzonera hispanica. Himija prirodnyh soedinenij = Chemistry of Natural Compounds.* 1992;(6):640-645. (In Russian).

13. Yang Y.-J., Yao J., Jin X.-J., Shi Z.-N., Shen T.-F., Fang J.-G., et al. Sesquiterpenoids and tirucallane triterpenoids from roots of *Scorzonera divaricate*. *Phytochemistry.* 2016;124:86-98.
https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.015.

14. Brjanskij O.V., Tolstihina V.V., Semenov A.A. Syringoresinol glucoside from *Scorzonera hispanica* cell culture. *Himija prirodnyh soedinenij = Chemistry of Natural Compounds.* 1992;(5):591-592. (In Russian).

15. Semenov A.A., Enikeev A.G., Khobrakova V.B., Razuvayeva Y.G., Nikolayev S.M. Study on the healing effect of syringaresinol β-D-monoglucoside. *International Journal of Biomedicine*. 2013;3(4):287-290. EDN: RPWEZV.

16. Agrawal P.K., Rastogi R.O., Osterdahl B.G. ^{13}C NMR spectral analysis of dihydrobenzofuran lignans. *Organic Magnetic Resonance*. 1983;21(2):119-121.
https://doi.org/10.1002/omr.1270210208.

17. Agrawal P.K., Thakur R.S. ^{13}C NMR spectroscopy of lignans and neolignans. *Magnetic Resonance in Chemistry.* 1985;23(6):389-418.
http://doi.org/10.1992/mrc.1260230602.

18. Salama O., Chandhuri R.K., Sticher O.A. A lignan glucoside from *Euphrasia rostkoviana. Phytochemistry.* 1981;20(11):2603-2604.
https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)83110-X.

19. Tolstihina V.V., Semenov A.A. Minor metabolites of *Scorzonera hispanica* cell culture. *Rastitel'nye resursy.* 1998;34(2):77-80. (In Russian).

20. Tolstihina V.V., Semenov A.A. Minor lignans from cultured *Scorzonera hispanica* cells. *Rastitel'nye resursy.* 1999;35(1):87-89. (In Russian).

21. Lundgren L.N., Popoff T., Theander O. Dilignol glycosides from needles of *Picea abies. Phytochemistry.* 1981;20(8):1967-1969.
https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)84046-0.

22. Oshima Y., Takuta S., Hikino H., Deyama T., Rinoshita G. Anticomplementary activity of the constituents of *Eucommia ulmoides* bark. *Journal of Ethnopharmacology.* 1988;23(2-3):159-164. https://doi.org/10.1016/0378-8741(88)90003-7.

23. Ovodov Ju.S., Frolova G.M., Nefedova M.Ju., Eljakov G.B. Glycosides of *Eleutherococcus senticosus*. II. Structure of eleutherosides A, B, C, D. *Himija prirodnyh soedinenij = Chemistry of Natural Compounds.* 1967;(1):63-64. (In Russian).

24. Pelter A., Ward R.S., Watson D.J., Jack I.R. Synthesis and N.M.R. spectra of 2,6- and 2,4-diaryl-3,7-dioxabicyclo-(3.3.0) octanes. *Journal of the Chemical Society*. *Perkin Transaction 1*. 1982;1:183-190. https://doi.org/10.1039/P19820000183.

25. Priyashree S., Jha S., Pattanayak S.P. A review on *Cressa cretica* Linn.: a halophytic plant. *Pharmacognosy Review*. 2010;4(8):161-166. https://doi.org/10.4103/0973-7847.70910.

26. Lami N., Kadota Sh., Kikuchi T., Momose Y. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. III. Identification of Ca^{2+} channel antagonistic compound from the methanol extract. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 1991;39(6):1551-1555. https://doi.org/10.1248/cpb.39.1551.

27. Nakamura S., Zhang Y., Matsuda H., Ninomiya K., Muraoka O., Yoshikawa M. Chemical structure and hepatoprotective effects of constituents from leaves of *Salacia chinensis*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 2011;59(8):1020-1028. https://doi.org/10.1248/cpb.59.1020.

28. Golovkin B.N., Rudenskaja R.N., Trofimova I.A., Shreter A.I. *Biologically active substances of plant origin: monograph*. Moscow: Nauka; 2001. 764 p. (In Russian).

29. Marshalkin M.F., Orobinskaja V.N. Dietary fibers of scorzoner and oat root and their therapeutic and preventive use. *Uspehi sovremennogo estestvoznanija.* 2002;(2):77-84. (In Russian). EDN: TFYDQH.

30. Sampiev A.M., Shevchenko A.I., Hotjava M.R., Nikiforova E.B., Bykova O.A. The researching of flavonoids, phenol carbonic and organic acids in *Scorzonera hispanica* L. *Voprosy biologicheskoj, medicinskoj i farmacevticheskoj himii = Problems of BiologicaL, Medical and Pharmaceutical Chemistry.* 2018;21(1):25-29. (In Russian). https://doi.org/10.29296/25877313-2018-01-05. EDN: YPUTYY.

31. Granica S., Lohwasser U., Jöhrer K., Zidorn C. Qualitative and quantitative analyses of secondary metabolites in aerial and subaerial of *Scorzonera hispanica* L. (black salsify). *Food Chemistry*. 2015;173:321-331. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.006.

32. Nosov A.M. Functions of secondary plant metabolites *in vivo* and *in vitro. Fiziologija rastenij.* 1994;41(6):873-878. (In Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Семёнов Аркадий Алексеевич,
д.х.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
laps1936@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-7158-884X

Еникеев Андрей Густавович,
к.б.н., ведущий научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉enikeev@sifibr.irk.ru
https://orcid.org/0000-0002-4111-0412

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 20.04.2023.
Одобрена после рецензирования 10.06.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Arkadiy A. Semenov,
Dr. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsr, 664033,
Russian Federation,
laps1936@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-7158-884X

Andrey G. Enikeev,
Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsr, 664033,
Russian Federation,
✉enikeev@sifibr.irk.ru
https://orcid.org/0000-0002-4111-0412

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 20.04.2023.
Approved after reviewing 10.06.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 661.123
EDN: JRWASG
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-416-424

Сверхкритический экстракт из бурой водоросли Японского моря *Undaria pinnatifida* как источник биологически активных веществ

О.В. Табакаева✉, А.В. Табакаев

Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Российская Федерация

Аннотация. *Биологически активные вещества водорослей имеют практическое применение в фармацевтической отрасли, производстве продуктов питания для человека и кормов для животных и в других сферах. Получение химически безопасных экстрактов высокого качества из бурых водорослей, характеризующихся широким спектром биологически активных веществ, является актуальной задачей. Целью представленного исследования являлась характеристика сверхкритического экстракта из бурой водоросли U. pinnatifida, идентификация и оценка содержания биологически активных веществ. Содержание каротиноидов, фенольных соединений, маннита определяли спектрофотометрическим методом, жирнокислотный анализ проводили с помощью газо-жидкостной хроматографии, качественный состав каротиноидов и фенольных соединений анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Сверхкритическая экстракция CO_2 с использованием в качестве полярного модификатора этилового спирта бурой водоросли U. pinnatifida характеризуется высокой эффективностью в части извлечения жирных кислот, каротиноидов и фенольных соединений. Каротиноидный профиль полученного сверхкритического экстракта бурой водоросли U. pinnatifida характеризуется присутствием 14 представителей, максимально представлены фукоксантин (58,1% от суммы), зеаксантин (12,6% от суммы) и фукоксантинол (14,5% от суммы). Жирнокислотный состав сверхкритического экстракта бурой водоросли U. pinnatifida определяется присутствием 20 представителей, основными из которых являются пальмитиновая, олеиновая, арахидоновая и эйкозопентаеновая кислоты. Класс полиненасыщенных жирных кислот является преобладающим, содержание жирных кислот семейств ώ-6 и ώ-3 несущественно различается. Установлено, что общее содержание фенольных соединений составляет 13,45+0,43 мг галловой кислоты/г, наиболее представлены эпикатехин, галлатэпигаллокатехин, сиринговая, кумаровая, феруловая и салициловая кислоты.*

Ключевые слова: *сверхкритические экстракты, бурая водоросль U. pinnatifida, биологически активные вещества, ксантофиллы, жирные кислоты, фенолы*

Финансирование. *Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (проект 23-26-00197).*

Для цитирования: Табакаева О.В., Табакаев А.В. Сверхкритический экстракт из бурой водоросли Японского моря *Undaria pinnatifida* как источник биологически активных веществ // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 416–424. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-416-424. EDN: JRWASG.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Supercritical extract from the Japanese sea brown algae *Undaria pinnatifida* as a source of bioactive compounds

Oksana V. Tabakaeva✉, Anton V. Tabakaev

Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. *Bioactive compounds contained in algae have practical applications in the pharmaceutical industry, production of human food and animal feed, and other fields. Since brown algae contain a wide range of bioactive substances, producing high-quality and chemically safe extracts on their basis is an urgent task. This study was aimed at characterization of supercritical extract from the corresponding algae, as well as the identification and evaluation of the content of bioactive compounds. The content of carotenoids, phenolic compounds and mannitol was determined by UV-Vis spectroscopy; a fatty acid analysis was carried out by GLPC; the qualitative composition of carotenoids and phenolic compounds was analyzed by HPLC. Supercritical CO_2 extraction of the brown alga U. rinnatifida with EtOH as a polar modifier is characterized by high ejection efficiency of fatty acids, phenolic compounds and carotenoids.*

© Табакаева О.В., Табакаев А.В., 2023

The latter profile of the collected supercritical extract consists of 14 representatives. In particular, fucoxanthin (58.1% of the sum), zeaxanthin (12.6% of the sum), and fucoxanthinol (14.5% of the sum) are the most abundant compounds. Palmitic acid, oleic acid, arachidonic acid, and eicosapentaenoic acids are the main of the 20 fatty acids found in the corresponding extract. However, the class of polyunsaturated fatty acids is predominant, which content of the ώ-6 and ώ-3 groups does not differ significantly. The total content of phenolic compounds is 13.45+0.43 mg/g of gallic acid equivalent. For instance, the most represented phenolic substances are epicatechin, epigallocatechin gallate, syringic acid, coumaric acid, ferulic acid and salicylic acid.

Keywords: *supercritical extracts, brown algae U. rinnatifida, bioactive substances, xanthophylls, fatty acids, phenols*

Funding. *The work was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project 23-26-00197).*

For citation: Tabakaeva O.V., Tabakaev A.V. Supercritical extract from the Japanese sea brown algae *Undaria pinnatifida* as a source of bioactive compounds. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(3):416–424. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-416-424. EDN: JRWASG.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на долгую историю использования водорослей в различных сферах жизни человека, их биогенный и биотехнологический потенциал все еще остается в значительной степени неизученным, что обусловливает активное исследование состава и содержания биологически активных веществ (БАВ) с целью дальнейшего практического использования [1]. Морские водоросли (бурые, зеленые, красные) известны как богатый источник биологически активных соединений, включая белки, минералы, витамины, полисахариды, полифенолы, флоротанины, пигменты, ненасыщенные жирные кислоты, стерины и фитогормоны [2–4]. БАВ морских водорослей характеризуются свойствами различной направленности – антиоксидантными [5], антибактериальными, противовоспалительными и антиканцерогенными [6, 7]. БАВ водорослей имеют практическое применение в фармацевтической отрасли, производстве продуктов питания для человека и кормов для животных, а также интегрированных систем выращивания растений [1, 8, 9].

Наиболее приемлемыми и часто используемыми способами применения БАВ водорослей как компонентов для обогащения пищевых систем или в качестве фармацевтических компонентов является добавление водорослей в нативном виде или в виде экстракта. При получении экстрактов для более эффективного извлечения БАВ из измельченной биомассы водорослей следует выбирать подходящий растворитель (например, воду и органические растворители). Применение традиционных методов экстракции, в частности экстракции в аппарате Сокслета, твердожидкостной экстракции и жидкостно-жидкостной экстракции, имеет некоторые недостатки, например, использование больших объемов растворителей и сложное разделение экстрагируемых веществ [10]. В качестве альтернативы традиционным процедурам экстракции предлагается применение сверхкритической технологии, позволяющей получать химически безопасные экстракты высокого качества [11].

Сверхкритическая CO_2-экстракция, использующая высокие давления, является отличной техникой для получения натуральных термолабильных соединений. Кроме того, в получаемых экстрактах не имеется остатков органических растворителей, что происходит при обычных методах экстракции, растворители могут быть токсичными, например, в случае метанола и гексана. Легкое удаление растворителя из конечного продукта, высокая селективность и использование умеренных температур в процессе экстракции являются главными привлекательными факторами сверхкритической экстракции, приводя к значительному увеличению исследований для применения получаемых экстрактов в пищевой и фармакологической промышленности [12]. Сверхкритический углекислый газ, в частности, является привлекательным сверхкритическим растворителем из-за низких критических температур использования (30–40 °C), его нетоксичности и инертности.

Также необходимо учитывать, что с помощью спиртовых и водных экстрактов получается извлечь не все типы соединений, присутствующих в сырье. На современном этапе необходимо извлечение из растительной матрицы не только основных компонентов, но и минорных соединений. Сверхкритическая CO_2-экстракция с использованием сорастворителя этанола позволяет экстрагировать из растительной матрицы более расширенный спектр биологически активных веществ по сравнению с обычными методами экстракции, в том числе и термолабильные соединения [13, 14]. Использование сверхкритических флюидов как растворителей является интересной альтернативой для получения натуральных продуктов высокого качества без создания токсичных остатков. Внедрение технологии сверхкритической экстракции возрастает благодаря новым техническим достижениям [10].

Целью работы являлась характеристика сверхкритического экстракта из бурой водоросли *Undaria pinnatifida,* идентификация и оценка содержания БАВ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследований. В качестве растительной матрицы для получения сверхкритического экстракта были использованы талломы бурой водоросли *Undaria pinnatifida* (Harv.) Sur. Данная водоросль является однолетней. Слоевище состоит из пластины, стволика и ризоидов. Пластина тонкая, перепончатая, перисторассеченная, темно-зеленого или оливкового цвета, длиной 40–80 см, шириной 25–45 см. В молодом возрасте пластина овальная. Стволик 8–12 см, внизу округлый или слабосдавленный, вверху уплощенный, постепенно переходит в широкое плоское ребро пластины. Данный вид бурых водорослей произрастает в водах Китая, Японии, Кореи, а также США, Великобритании, Франции, Италии, Испании, Аргентины, Австралии и Новой Зеландии. Растет на литорали и в сублиторали на глубинах 0,5–6,0 м, на скалистом и каменистом фунтах у открытых прибойных участков побережья. Образует небольшие заросли между крупными камнями

и валунами. Встречается в сообществах с бурыми водорослями и морскими травами, является объектом культивирования в странах Юго-Восточной Азии. Биомасса составляет до 2 кг/м^2, плотность поселения – 1–10 экз/м^2, масса одного слоевища – до 0,4 кг [15].

Получение сверхкритического экстракта. Экстракцию CO_2 в сверхкритическом состоянии проводили с использованием системы TharSCF SFE-500 (Waters, Pittsburgh, США). Скорость потока составляла 10 мл/мин для жидкого CO_2 и 1,0 мл/мин для этанола. Для экстракции использовали образцы 28 г сухого таллома бурой водоросли *U. pinnatifida*. Используемое давление – 300 бар, время экстракции – 60 мин, температура процесса – 60 °С.

Содержание каротиноидов определяли спектрофотометрическим методом. Пигментный комплекс выделяли 100%-м ацетоном. Гомогенат фильтровали через фильтр Шотта при помощи водоструйного насоса. Для полноты извлечения каротиноидов остаток с фильтра переносили в ступку для повторной экстракции еще 5 мл ацетона. Остаток на фильтре промывали ацетоном до обесцвечивания растворителя. Каротиноиды переводили в гексан, смешивая в делительной воронке объединенные ацетоновые экстракты с 5 мл гексана и осторожно добавляя 150 мл 5%-го водного раствора NaCl для разделения гексанового и водного слоев. Экстракт промывали небольшим количеством дистиллированной воды (20–30 мл) для удаления следов ацетона, после чего сушили в течение суток безводным сульфатом натрия. К аликвоте спиртового раствора приливали равное количество 5%-го раствора NaOH в этаноле и ставили в темное место на 12 ч. Каротиноиды реэкстрагировали гексаном, который промывали водой для удаления следов щелочи и высушивали безводным сульфатом натрия. Количественное содержание каротиноидов определяли спектрофотометрически на сканирующем спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) в ацетоновой вытяжке при длине волны 450 нм [16].

Качественный состав каротиноидов анализировали методом ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа высокого давления LC-20A (Shimadzu, Япония), снабженного колонкой Zorbax ODS (4,6×250 мм), скорость подачи элюента – 0,8 мл/мин. Количественная оценка содержания пигментов проводилась с использованием спектров поглощения в потоке, полученных на детекторе SPD-M20A *(Shimadzu, Япония)* со встроенной фотодиодной матрицей. Для анализа полярных свободных каротиноидов была использована следующая система: вода–ацетонитрил 50–50, 0–30 мин – линейный градиент до 100% ацетонитрила; 30–50 мин – 100% ацетонитрил.

Жирнокислотный анализ проводили с помощью ГЖХ-масс-спектрометра (Hewlett-Packard, США). Липиды из образца экстрагировали смесью хлороформ–метанол (2:1). Хлороформенную фазу упаривали и обрабатывали 1%-м метилатом натрия при температуре 56 °С в течение 20 мин. Метиловые эфиры жирных кислот экстрагировали хлороформом и анализировали [17, 18].

Содержание фенольных веществ и маннита. Для определения суммарного содержания фенольных соединений использован спектрофотометрический метод с реактивом Фолина-Чокалтеу. Метод основан на восстановлении смеси фосфорновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот в щелочной среде и является основным методом для определения общего содержания фенолов в лекарственном растительном сырье и пищевых продуктах[1]. Использовался сканирующий спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu, Япония). Количественное определение суммы фенольных соединений проведено в пересчете на галловую кислоту.

Определение содержания маннита проводили спектрофотометрическим методом, основанным на образовании медных комплексов при периодатном окислении[2].

Идентификация фенольных соединений проводилась с использованием ВЭЖХ на жидкостном хроматографе высокого давления LC-20A (Shimadzu, Япония) при температуре 30 °С на обратнофазной колонке Phenomenex RPC18 250×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США). Экстракты пропускали через фильтр 0,45 мкм (Millipore, США) перед инъекцией в ВЭЖХ. Общее время выполнения составило около 50 мин при скорости потока 0,6 мл/мин. Подвижной фазой был метанол (б): вода (а) с 0,2%-й уксусной кислотой (65:35, в/в). Градиентное элюирование проводили следующим образом: 0–2 мин, 5% б изократический; 2–10 мин, линейный градиент 5–25% б; 10–20 мин, линейный градиент 25–40% В; 20–30 мин, линейный градиент 40–50% В; 30–40 мин, линейный градиент 50–100% В; 40–45 мин, 100% В изократический и 45–55 мин, линейный градиент 100–5% В. Индивидуальные фенольные соединения идентифицировали путем сравнивания их времени удерживания с тем же для подлинных стандартов (Sigma, США) с использованием тех же условий. Одновременный контроль длины волны обнаружения был установлен на 324 нм для хлорогеновой, кофейной, 2,5-дигидроксибензойной, кумаровой, феруловой и салициловой кислот и 277 нм для галлата эпигалокатехина (ЭГКГ), эпикатехина (ЭК), галлата эпикатехина (ЭКГ) и сиринговой кислоты. Количественная оценка каждого соединения была определена на основании измерений пиковой площади с использованием градуировочного графика для каждого соединения.

Все исследования проводили в 3-кратной повторности. Экспериментальные данные представлены в виде M±m. Статистическую обработку проводили с использованием пакетов прикладных статистических программ Excel. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента при 95%-м уровне значимости.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первоначально полученный сверхкритический экстракт бурой водоросли *U. pinnatifida* был проанализирован на предмет содержания основных соединений и групп соединений, характерных для состава бурых водорослей. Полученные данные представлены в табл. 1. Содержание биологически активных веществ в бурой водоросли *U. pinnatifida* представлено в мг/г сухого веса водоросли по результатам экстракции традиционными органическими растворителями [4, 19]. Выход CO_2-экстракта составил 0,77%. Выход от исходного содержания в водоросли, % отн., рассчитан как соотношение содержания в исходной водоросли, мг/г сухого веса водоросли, к содержанию в экстракте, пересчитанном в мг/г сухого веса водоросли.

Представленные в табл. 1 данные демонстрируют,

Таблица 1. Содержание биологически активных веществ в бурой водоросли *U. pinnatifida* и сверхкритическом экстракте

Table 1. Content of biologically active substances in brown algae *U. pinnatifida* and supercritical extract

Группа соединений, соединения	Содержание в исходной водоросли, мг/г сухого веса	Содержание в экстракте, мг/г сухого веса CO_2-экстракта	Выход от исходного содержания в водоросли, % отн.
Жирные кислоты	12,30±0,52	22,41±0,98	68,70±3,10
Полифенолы	140,62±6,17	25,31±1,09	8,3±0,31
Маннит	53,75±2,40	6,50±0,25	5,61±0,20
Хлорофилл	0,30±0,01	0,01±0,00	1,55±0,03
Каротиноиды	0,08±0,03	0,05±0,00	28,99±1,26

что применение сверхкритической CO_2-экстракции позволяет достаточно эффективно извлекать жирные кислоты, каротиноиды, фенольные соединения и маннит. Необходимо отметить существенно высокий выход жирных кислот (около 70% отн.), что, вероятно, объясняется более эффективной растворимостью данных соединений в CO_2, чем в традиционных органических растворителях. Выход других липофильных соединений – каротиноидов – также является достаточно высоким (около 30% отн.), что позволяет утверждать о перспективности использования сверхкритической экстракции в качестве метода для получения экстрактов с высоким содержанием каротиноидов.

Исследование каротиноидного профиля полученного сверхкритического экстракта бурой водоросли *U. pinnatifida* позволило установить, что он характеризуется присутствием 14 представителей: *α*- и *β*-каротины, фукоксантин, фукоксантинол, зеаксантин, неоксантин, 9-*цис*-неоксантин, виолаксантин, лютеин, диатоксантин, диадитоксантин, кантаксантин, антероксантин, астаксантин. По количественному содержанию исследованные каротиноиды можно разделить на 2 группы – минорные (содержание менее 1%) и мажорные (более 1%). Количественный состав минорных каротиноидов сверхкритического экстракта бурой водоросли *U. pinnatifida* представлен на рис. 1.

Представленные на рис. 1 данные демонстрируют, что максимально представленными минорными каротиноидами являются *β*-каротин и кантаксантин, минимальное содержание определено для антероксантина. Лютеин, *α*-каротин, 9-*цис*-неоксантин и астаксантин характеризуются промежуточным содержанием.

Количественный состав мажорных каротиноидов сверхкритического экстракта бурой водоросли *U. pinnatifida* представлен на рис. 2.

Максимально представленными в исследованном сверхкритическом экстракте бурой водоросли *U. pinnatifida* мажорными каротиноидами являются фукоксантин (58,1% от суммы каротиноидов), зеаксантин (12,6% от суммы каротиноидов) и производное фукоксантина – фукоксантинол (14,5% от суммы каротиноидов). Содержание диатоксантина и диадитоксантина является минимальным (1,8 и 1,3% от суммы каротиноидов соответственно). Виолаксантин и неоксантин характеризуются невысоким содержанием (4,6 и 6,5% от суммы каротиноидов соответственно). Содержание неидентифицированных каротиноидов составило 1,8% от суммы каротиноидов.

Полученные данные согласовываются с результатами исследования каротиноидного состава других бурых водорослей [20, 21].

Кроме каротиноидов, в сверхкритическом экстракте присутствуют различные жирные кислоты. Содержание минорных (менее 1% от суммы) жирных кислот в сверхкритическом экстракте бурой водоросли *U. pinnatifida* представлено на рис. 3.

Согласно представленным на рис. 3 данным, жирнокислотный профиль сверхкритического экстракта бурой водоросли *U. pinnatifida* определяется присутствием 10 минорных представителей: пентадециловой, *цис*-9-гексадеценовой (ώ5 и ώ7), гептадеценовой, *цис,-цис,цис*-9,12,15-октадекатриеновой (α-линолевой), эйкозановой (арахиновой), эйкозодиеновой, эйкозотетраеновой, генэйкозотетраеновой, генэйкозопентаеновой кислот. Максимальным содержанием характеризуются 3 минорных жирных кислоты – 16:1, 20:2, 20:4, минимальным – 15:0 и 16:1 (ώ5). Содержание жирных кислот 17:1, 18:3, 20:0, 21:4 и 21:5 можно охарактеризовать как среднее среди минорных кислот.

Содержание мажорных жирных кислот (более 1% от суммы всех жирных кислот) в сверхкритическом экстракте бурой водоросли *U. pinnatifida* представлено на рис. 4.

Среди мажорных жирных кислот, согласно данным рис. 4, выделяются следующие кислоты: гексадекановая (пальмитиновая), *цис*-9-октадеценовая (олеиновая), *цис*-5,8,11,14-эйкозотетраеновая (арахидоновая), *цис,цис,цис*-8,11,14,17-эйкозатетраеновая и 5,8,11,14,17-эйкозопентаеновая, их содержание не менее 10% от суммы всех жирных кислот. Максимальное содержание определено для олеиновой и пальмитиновой кислот, однако необходимо отметить существенно высокое содержание (13,1%) эйкозопентаеновой кислоты. Гораздо меньшим содержанием характеризуются *цис,цис,цис*-11,14,17-эйкозатриеновая, *цис,цис,цис*-6,9,12-октадекатриеновая (гамма линоленовая), *цис,цис*-9,12-октадекадиеновая (линолевая), стеариновая и миристиновая кислоты.

Немаловажной характеристикой жирнокислотного профиля объекта является не только количественное содержание отдельных жирных кислот, но и содержание отдельных групп и семейств жирных кислот (насыщенных – НЖК, мононенасыщенных – МНЖК, полиненасыщенных – ПНЖК). На рис. 5 представлено соотношение НЖК, МНЖК и ПНЖК, а также омега-3 и омега-6 жирных кислот в сверхкритическом экстракте бурой водоросли *U. pinnatifida*.

Визуализированные на рис. 5 данные демон-

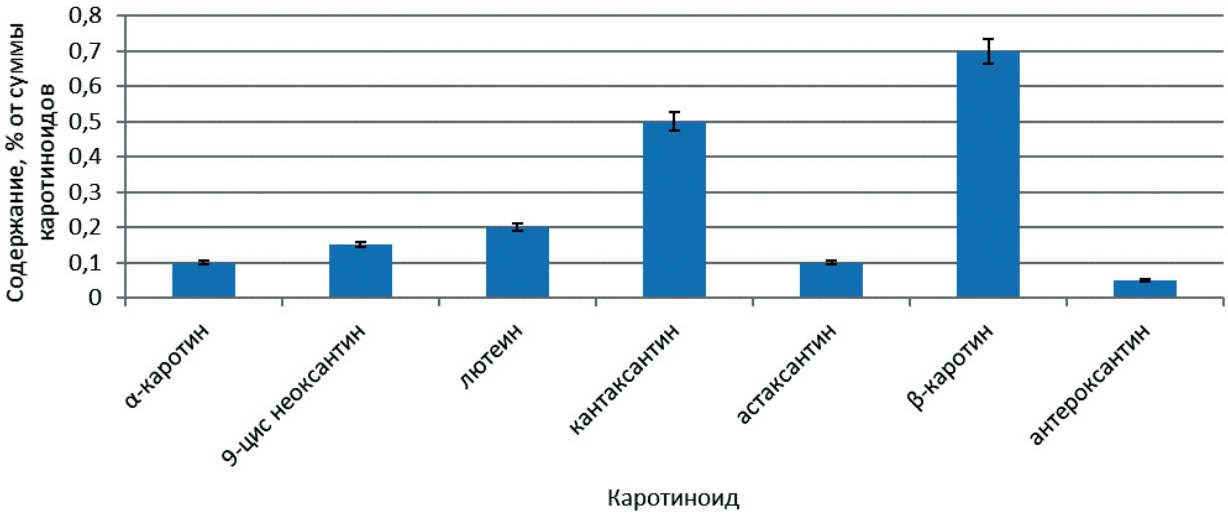


Рис. 1. Содержание минорных каротиноидов в сверхкритическом экстракте бурой водоросли *U. pinnatifida*
Fig. 1. Minor carotenoids content in the brown algae *U. pinnatifida* supercritical extract

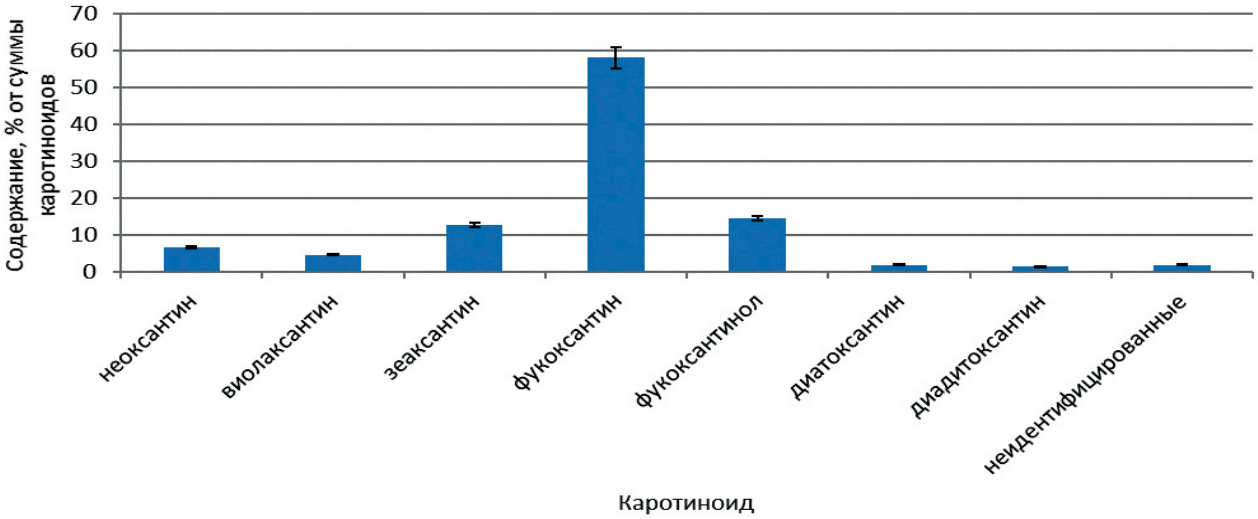


Рис. 2. Содержание мажорных каротиноидов в сверхкритическом экстракте бурой водоросли *U. pinnatifida*
Fig. 2. Major carotenoids content in the brown algae *U. pinnatifida* supercritical extract

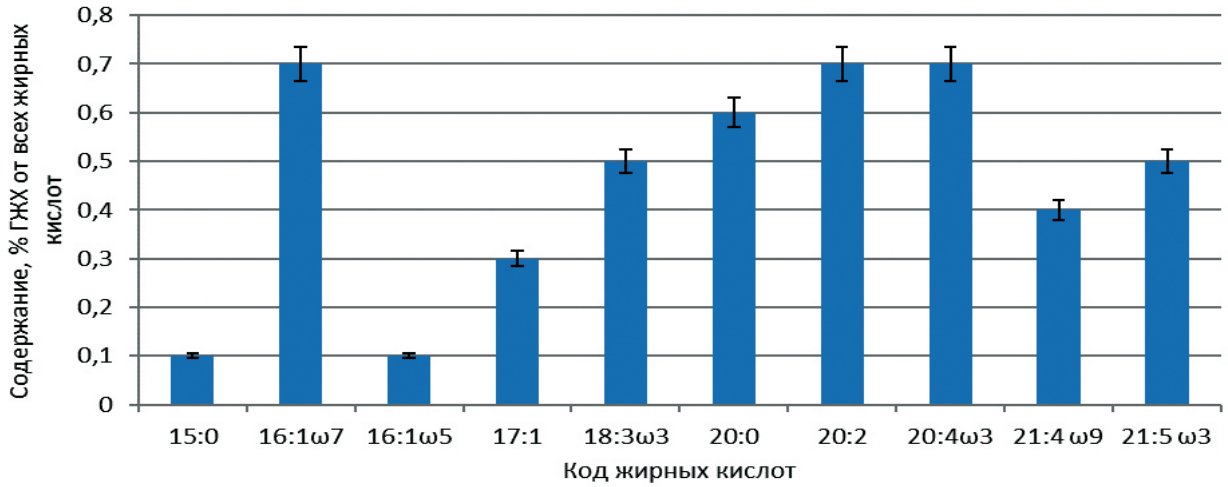


Рис. 3. Содержание минорных жирных кислот в сверхкритическом экстракте бурой водоросли *U. pinnatifida*
Fig. 3. Minor FAs content in the brown algae *U. pinnatifida* supercritical extract

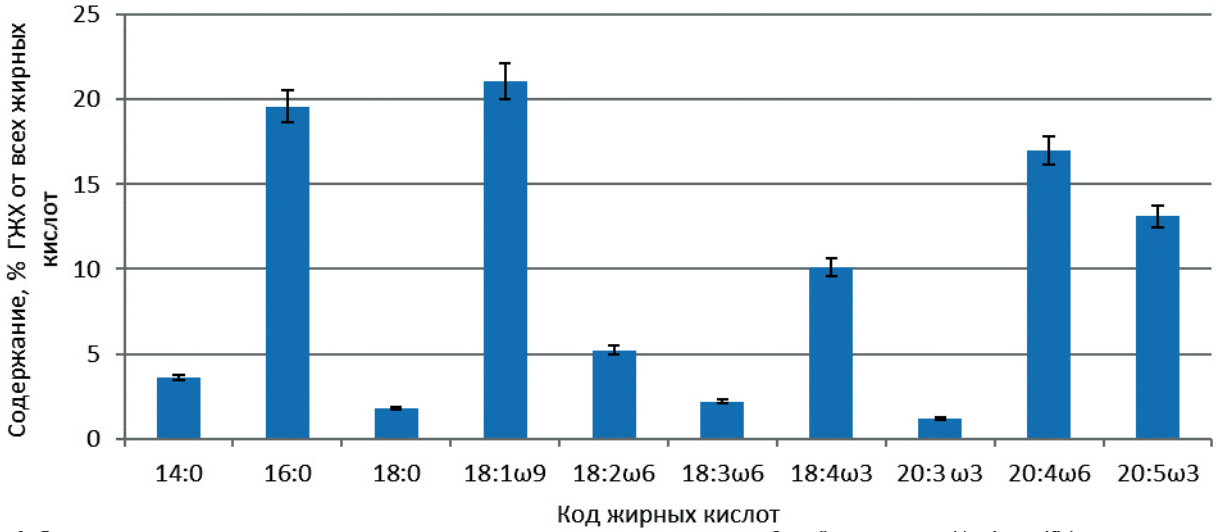


Рис. 4. Содержание мажорных жирных кислот в сверхкритическом экстракте бурой водоросли *U. pinnatifida*

Fig. 4. Major FAs content in the brown algae *U. pinnatifida* supercritical extract

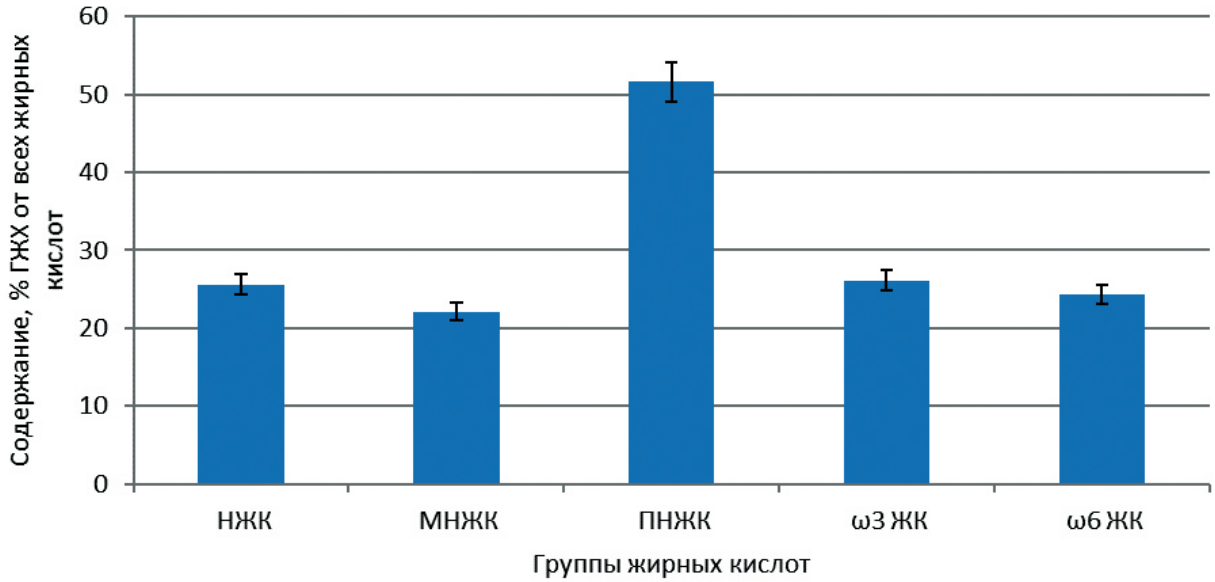


Рис. 5. Содержание отдельных групп и семейств жирных кислот в сверхкритическом экстракте бурой водоросли *U. pinnatifida*

Fig. 5. Content of individual groups and families of FAs in the brown algae *U. pinnatifida* supercritical extract

стрируют, что класс ПНЖК является преобладающим в составе сверхкритического экстракта бурой водоросли *U. pinnatifida*. Содержание НЖК и МНЖК несущественно отличается друг от друга. Отдельно необходимо отметить практически одинаковое содержание жирных кислот семейств ώ-6 и ώ-3, что характеризует исследуемый экстракт как перспективный с точки зрения биологической активности, проявляемой эссенциальными жирными кислотами.

Кроме исследованных липофильных соединений, в сверхкритическом экстракте бурой водоросли *U. pinnatifida* определено общее содержание фенольных соединений, которое составило 13,45+0,43 мг галловой кислоты/г. Содержание основных фенольных соединений, идентифицированных в сверхкритическом экстракте бурой водоросли *U. pinnatifida*, представлено в табл. 2.

Представленные в табл. 2 данные демонстрируют, что в составе сверхкритического экстракта бурой водоросли *U. pinnatifida* присутствует 9 фенольных соединений. Первым из фенольных соединений элюирует галлат эпигаллокатехина. Мажорными фенольными соединениями в экстракте являются эпикатехин, галлат эпигаллокатехина, сиринговая, кумаровая, феруловая и салициловая кислоты. Минимальное содержание определено для галлат эпикатехина и 2,5-дигидроксибензойной кислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты проведенных исследований позволяют сделать следующие выводы: сверхкритическая экстракция CO_2 с полярным модификатором этанолом бурой водоросли *U. pinnatifida* характеризуется высокой эффективностью в части извлечения жирных кислот, каротиноидов и фенольных соединений. Каротиноидный профиль полученного сверхкритического экстракта бурой

Таблица 2. Содержание основных фенольных соединений, идентифицированных в сверхкритическом экстракте бурой водоросли *U. pinnatifida*

Table 2. Content of the main phenolic compounds identified in the brown alga *U. pinnatifida* supercritical extract

Соединение	Длина волны, нм	Rt, мин	Содержание, мг/г
Кофейная кислота	324	10,49	2,30±0,11
2,5-дигидроксибензойная кислота		17,43	0,89±0,03
Кумаровая кислота		20,56	8,04±0,31
Феруловая кислота		24,19	14,88±0,53
Салициловая кислота		44,92	4,90±0,22
Галлат эпигаллокатехина	277	8,13	7,02±0,28
Эпикатехин		10,11	36,40±1,61
Галлат эпикатехина		13,00	0,52±0,01
Сиринговая кислота		14,78	41,28±2,06

водоросли *U. pinnatifida* характеризуется присутствием 14 представителей, максимально представлены фукоксантин (58,1% от суммы каротиноидов), зеаксантин (12,6% от суммы каротиноидов) и фукоксантинол (14,5% от суммы каротиноидов). Жирнокислотный состав сверхкритического экстракта бурой водоросли *U. pinnatifida* определяется присутствием 20 представителей, основными из которых являются пальмитиновая, олеиновая, арахидоновая и эйкозопентаеновая жирные кислоты. Класс ПНЖК является преобладающим, содержание жирных кислот семейств ώ-6 и ώ-3 различается несущественно. Установлено, что общее содержание фенольных соединений составляет 13,45+0,43 мг/г в перерасчете на галловую кислоту, наиболее представлены эпикатехин, галлат эпигаллокатехина, сиринговая, кумаровая, феруловая и салициловая кислоты.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Craigie J.S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture // Journal of Applied Phycology. 2011. Vol. 23, no. 3. P. 371–393. https://doi.org/10.1007/s10811-010-9560-4.

2. Gerasimenko N.I., Martyyas E.A., Busarova N.G. Composition of lipids and biological activity of lipids and photosynthetic pigments from algae of the families Laminariaceae and Alariaceae // Chemistry of Natural Compounds. 2012. Vol. 48, no. 5. P. 737–741. https://doi.org/10.1007/s10600-012-0371-5. EDN: RGDLHZ.

3. Суховеева М.В., Подкорытова А.В. Промысловые водоросли и травы морей Дальнего Востока: биология, распространение, запасы, технология переработки: монография. Владивосток: ТИНРО-центр, 2006. 243 с. EDN: QKYIZV.

4. Табакаева О.В., Табакаев А.В. Биологически активные вещества потенциально промысловых бурых водорослей Дальневосточного региона // Вопросы питания. 2016. Т. 85. N 3. С. 126–133. EDN: WFGBEB.

5. Rajauria G. In-vitro antioxidant properties of lipophilic antioxidant compounds from 3 brown seaweed // Antioxidants. 2019. Vol. 8, no. 12. P. 596–599. https://doi.org/10.3390/antiox8120596.

6. Meresse S., Fodil M., Fleury F. Fucoxanthin, a marine-derived carotenoid from brown seaweeds and microalgae: a promising bioactive compound for cancer therapy // International Journal of Molecular Sciences. 2020. Vol. 21, no. 23. P. 9273–9278. https://doi.org/10.3390/ijms21239273 .

7. Jesumani V., Du H., Aslam M. Potential use of seaweed bioactive compounds in skincare // Marine Drugs. 2019. Vol. 17, no. 12. P. 688–694. https://doi.org/10.3390/md17120688.

8. Gupta S., Abu-Ghannam N. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods // Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2011. Vol. 12, no. 4. P. 600–609. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.07.004 .

9. Salehi B., Sharifi-Rad J., Seca A.M.L., Pinto D.C.G.A., Michalak I., Trincone A., et al. Current trends on seaweeds: looking at chemical composition, phytopharmacology, and cosmetic applications // Molecules. 2019. Vol. 24, no. 22. P. 4182. https://doi.org/10.3390/molecules24224182.

10. Herrero M., Mendiola J.A., Cifuentes A., Ibañez E. Supercritical fluid extraction: recent advances and applications // Journal of Chromatography A. 2010. Vol. 1217, no. 16. P. 2495–2511. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.019.

11. Herrero M., Cifuentes A., Ibañez E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae // Food Chemistry. 2006. Vol. 98, no. 1. P. 136–148. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058.

12. Valderrama J.O., Perrut M., Majewski W. Extraction of astaxantine and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide // Journal of Chemical and Engineering. 2003. Vol. 48, no. 4. P. 827–830. https://doi.org/10.1021/je020128r.

13. Razgonova M.P., Tekutyeva L.A., Podvolotskaya A.B., Zakharenko A.M., Golokhvast K. *Zostera marina* L.: supercritical CO_2-extraction and mass spectrometric characterization of chemical constituents recovered from seagrass // Separations. 2022. Vol. 9, no. 7. P. 182. https://doi.org/10.3390/separations9070182.

14. Razgonova M.P., Cherevach E.I., Tekutyeva L.A., Kirilenko N.S., Golokhvast K. *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.: supercritical CO_2-extraction and mass spectrometric characterization of chemical constituents // Molecules. 2023. Vol. 28, no. 5. P. 2026. https://doi.org/10.3390/molecules28052026.

15. Дизюров В.Д., Кулепанов В.Н., Шапош-

никова Т.В. Атлас массовых видов водорослей и морских трав российского Дальнего Востока: монография. Владивосток: ТИНРО-центр, 2008. 328 с. EDN: QKTKOP.

16. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids. Isolation and analysis. Basel: Birkhäuser Verlag, 1995. Vol. 1A. 328 p.

17. Новак И.С. Количественный анализ методом газовой хроматографии. М.: Мир, 1978. 180 с.

18. Carreau J.P., Dubacq J.P. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts // Journal of Chromatography A. 1978. Vol. 151. P. 384–390. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88356-9.

19. Табакаева О.В., Семилетова Е.В. Фитохимический состав потенциально промысловых бурых водорослей Дальневосточного региона // Химия природных соединений. 2015. N 4. С. 529–531.

20. Pereira A.G., Otero P., Echave J., Carreira-Casais A., Chamorro F., Collazo N., et al. Xanthophylls from the sea: algae as source of bioactive carotenoids // Marine Drugs. 2021. Vol. 19, no. 4. P. 188. https://doi.org/10.3390/md19040188.

21. Heffernan N., Smyth T., FitzGerald R.J., Vila-Soler A., Mendiola J., Ibáñez E., et al. Comparison of extraction methods for selected carotenoids from macroalgae and the assessment of their seasonal/spatial variation // Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2016. Vol. 37. P. 221–228. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.004.

REFERENCES

1. Craigie J.S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology.* 2011;23(3):371-393. https://doi.org/10.1007/s10811-010-9560-4.

2. Gerasimenko N.I., Martyyas E.A., Busarova N.G. Composition of lipids and biological activity of lipids and photosynthetic pigments from algae of the families Laminariaceae and Alariaceae. *Chemistry of Natural Compounds.* 2012;48(5):737-741. https://doi.org/10.1007/s10600-012-0371-5. EDN: RGDLHZ.

3. Suhoveeva M.V., Podkorytova A.V. *Commercial algae and grasses of the seas of the Far East: biology, distribution, reserves, processing technology: monograph.* Vladivostok: TINRO-centr; 2006. 243 p. (In Russian). EDN: QKYIZV.

4. Tabakaeva O.V., Tabakaev A.V. Biologically active agents of potential trade brown seaweed of the Far East Region. *Voprosy pitanija = Problems of Nutrition.* 2016;85(3):126-133. (In Russian). EDN: WFGBEB.

5. Rajauria G. In-vitro antioxidant properties of lipophilic antioxidant compounds from 3 brown seaweed. *Antioxidants.* 2019;8(12):596-599. https://doi.org/10.3390/antiox8120596.

6. Meresse S., Fodil M., Fleury F. Fucoxanthin, a marine-derived carotenoid from brown seaweeds and microalgae: a promising bioactive compound for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21(23):9273-9278. https://doi.org/10.3390/ijms21239273.

7. Jesumani V., Du H., Aslam M. Potential use of seaweed bioactive compounds in skincare. *Marine Drugs.* 2019;17(12):688-694. https://doi.org/10.3390/md17120688.

8. Gupta S., Abu-Ghannam N. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 2011;12(4):600-609. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.07.004.

9. Salehi B., Sharifi-Rad J., Seca A.M.L., Pinto D.C.G.A., Michalak I., Trincone A., et al. Current trends on seaweeds: looking at chemical composition, phytopharmacology, and cosmetic applications. *Molecules.* 2019;24(22):4182. https://doi.org/10.3390/molecules24224182.

10. Herrero M., Mendiola J.A., Cifuentes A., Ibañez E. Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *Journal of Chromatography A.* 2010;1217(16):2495-2511. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.019.

11. Herrero M., Cifuentes A., Ibañez E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chemistry.* 2006;98(1):136-148. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058.

12. Valderrama J.O., Perrut M., Majewski W. Extraction of astaxantine and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical and Engineering.* 2003;48(4):827-830. https://doi.org/10.1021/je020128r.

13. Razgonova M.P., Tekutyeva L.A., Podvolotskaya A.B., Zakharenko A.M., Golokhvast K. *Zostera marina* L.: supercritical CO_2-extraction and mass spectrometric characterization of chemical constituents recovered from seagrass. *Separations.* 2022;9(7):182. https://doi.org/10.3390/separations9070182.

14. Razgonova M.P., Cherevach E.I., Tekutyeva L.A., Kirilenko N.S., Golokhvast K. *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.: supercritical CO_2-extraction and mass spectrometric characterization of chemical constituents. *Molecules.* 2023;28(5):2026. https://doi.org/10.3390/molecules28052026.

15. Dizjurov V.D., Kulepanov V.N., Shaposhnikova T.V. *Atlas of mass species of algae and sea grasses of the Russian Far East: monograph.* Vladivostok: TINRO-centr; 2008. 328 p. (In Russian). EDN: QKTKOP.

16. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. *Carotenoids. Isolation and analysis*. Basel: Birkhäuser Verlag; 1995, vol. 1A. 328 p.

17. Novak I.S. *Quantitative analysis by gas chromatography.* Moscow: Mir; 1978. 180 p. (In Russian).

18. Carreau J.P., Dubacq J.P. Adaptation of a macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts. *Journal of Chromatography A.* 1978;151:384-390. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)88356-9

19. Tabakaeva O.V., Semiletova E.V. Phytochemical composition of potentially commercial brown algae of the Far Eastern region. *Himija prirodnyh soedinenij = Chemistry of Natural Compounds.* 2015;(4):529-531. (In Russian).

20. Pereira A.G., Otero P., Echave J., Carreira-Casais A., Chamorro F., Collazo N., et al. Xanthophylls from the

sea: algae as source of bioactive carotenoids. *Marine Drugs.* 2021;19(4):188. https://doi.org/10.3390/md19040188.

21. Heffernan N., Smyth T., FitzGerald R.J., Vila-Soler A., Mendiola J., Ibáñez E., et al. Comparison of extraction methods for selected carotenoids from macroalgae and the assessment of their seasonal/spatial variation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies.* 2016;37:221-228. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.004.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Табакаева Оксана Вацлавовна,
д.т.н., доцент, профессор базовой кафедры пищевой и клеточной инженерии,
Дальневосточный федеральный университет,
690922, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10,
Российская Федерация,
✉yankovskaya68@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-7068-911X

Табакаев Антон Вадимович,
к.т.н., доцент базовой кафедры пищевой и клеточной инженерии,
Дальневосточный федеральный университет,
690922, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10,
Российская Федерация,
tabakaev92@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-5658-5069

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 15.04.2023.
Одобрена после рецензирования 08.06.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Oksana V. Tabakaeva,
Dr. Sci. (Engineering), Associate Professor, Professor,
Far Eastern Federal University,
10, Ajax Village, Russkii Isl., Vladivostok, 690922, Russian Federation,
✉yankovskaya68@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-7068-911X

Anton V. Tabakaev,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Far Eastern Federal University,
10, Ajax Village, Russkii Isl., Vladivostok, 690922, Russian Federation,
tabakaev92@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-5658-5069

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 15.04.2023.
Approved after reviewing 08.06.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 633.853.52: 631.522:575:577.29
EDN: BMAWTK
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-425-433

К вопросу о микросателлитных ассоциациях культурной сои Амурской области с сельскохозяйственными признаками

О.Н. Бондаренко✉, П.Д. Тимкин, Л.Е. Иваченко, А.А. Блинова, А.А. Пензин

Всероссийский научно-исследовательский институт сои, г. Благовещенск, Российская Федерация

Аннотация. *В исследовании выполнялся поиск и оценка силы корреляции между длиной микросателлитных локусов и хозяйственно-ценными признаками. В опыте по маркированию генетических систем сортов сои ДНК выделяли с помощью готового коммерческого набора, проводили стандартную ПЦР на готовой реакционной смеси. Проанализированы 18 сортов селекции Всероссийского научно-исследовательского института сои с использованием 15 пар праймеров, из которых наиболее специфично себя проявили и полностью пригодны для идентификации и паспортизации имеющихся генотипов сои 8 (Satt1, Satt2, Satt5, Satt9, Soyhsp176, Satt681, Satt141, Satt181) и 1 частично (Sat_263). Корреляционный анализ проводился путем расчета коэффициента взаимной сопряженности Пирсона. Для оценки возможного влияния на хозяйственно-ценные признаки в базах данных NCBI и soybase провели поиск ассоциаций простых последовательных повторов (SSRs) с локусами количественных признаков (QTLs). В результате корреляционного анализа отметили прямую взаимосвязь длин локусов Satt5, Sat_263, Satt181 и обратную у Satt2 с высотой растения: среднее значение коэффициента корреляции (r) равно 0,485; 0,55; 0,435 и -0,422 соответственно. Прямая зависимость установлена между Satt1(r= 0,561) и Satt2 (r= 0,562) и массой семян растений, обратная – между Satt9 (r= -0,453), Satt681 (r= -0,527) и массой семян. С признаком потенциальной урожайности обнаружена слабая обратная корреляция у Satt2 (r= -0,321). Это свидетельствует о том, что микросателлиты могут проявлять себя как маркер определенного признака.*

Ключевые слова: *соя, SSR-анализ, ДНК-маркеры, микросателлитные локусы, молекулярно-генетическая паспортизация*

Для цитирования: Бондаренко О.Н., Тимкин П.Д., Иваченко Л.Е., Блинова А.А., Пензин А.А. К вопросу о микросателлитных ассоциациях культурной сои Амурской области с сельскохозяйственными признаками // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С.425–433. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-425-433. EDN: BMAWTK.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

To the question of microsatellite associations of cultivated soybean of the Amur Oblast with agricultural traits

Ol'ga N. Bondarenko✉, Pavel D. Timkin, Lyubov E. Ivachenko, Anastasia A. Blinova, Andrey A. Penzin

All-Russian Research Institute of Soybean, Blagoveshchensk, Russian Federation

Abstract. *This prospecting study evaluated the correlation strength between the length of microsatellite loci and valuable agricultural traits. For labeling the genetic systems of soybean varieties, DNA was isolated using a ready-made kit followed by subjecting the manufactured reaction mixture to standard PCR. In total, 15 primer pairs were used to analyze 18 varieties of the All-Russian Soybean Research Institute selection. Eight samples (Satt1, Satt2, Satt5, Satt9, Soyhsp176, Satt681, Satt141 and Satt181) were the most specific and fully suitable for the identification and certification of available soybean genotypes; however, sample Sat_263 was only partially applicable. The possible influence of loci on agricultural traits was determined by searching for associations of simple sequence repeats (SSRs) with quantitative trait loci (QTLs) in the NCBI and soybase databases. To identify the statistical relationship between different attributes and loci lengths, a correlation analysis was performed by calculating Pearson's coefficient. This analysis revealed a direct relationship between the length of Satt5, Sat_263 and Satt181 loci and plant height, with an inverse relationship being observed in the case of Satt2. The mean value*

© Бондаренко О.Н., Тимкин П.Д., Иваченко Л.Е., Блинова А.А., Пензин А.А., 2023

of the correlation coefficient (r) comprised 0.485, 0.55, 0.435 and -0.422, respectively. Samples Satt1(r = 0.561) and Satt2 (r = 0.562) indicate a direct correlation between their length and plant seed weight, while an inverse correlation was established in the case of Satt9 (r= -0.453) and Satt681 (r= -0.527). A weak inverse correlation was found with the trait of potential yield with Satt2 (r = -0.321). This indicates the ability of microsatellites to act as a marker of a particular trait.

Keywords: *soybean, SSR-analysis, DNA markers, microsatellite loci, molecular genetic certification*

For citation: Bondarenko O.N., Timkin P.D., Ivachenko L.E., Blinova A.A., Penzin A.A. To the question of microsatellite associations of cultivated soybean of the Amur Oblast with agricultural traits. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(3):425–433. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-425-433. EDN: BMAWTK.

ВВЕДЕНИЕ

Среди возделываемых сельскохозяйственных культур ввиду высокой питательной ценности соя является одной из самых востребованных культур, что делает ее важным объектом для исследований и объясняет необходимость постоянного ее улучшения и выведения новых сортов, что, в свою очередь, направлено на обеспечение потребностей населения. В последние годы на помощь селекционерам пришла биотехнология, что значительно упрощает и ускоряет селекционный процесс и, как итог, может привести к значительному увеличению темпов прироста хозяйственно-ценных признаков [1–3].

Несмотря на активное изучение молекулярных маркеров сои, генетические особенности сортов амурской селекции изучены недостаточно. Для их анализа используются локусы количественных признаков (QTLs) и локусы простых последовательных повторов (SSRs). Анализ QTLs может основываться на изучении фенотипических проявлений. В случае SSRs достоверно неизвестно их влияние на какой-либо признак. Чаще всего они используются для картирования генома, определения родства или ДНК-паспортизации сортов сельскохозяйственных растений, что на сегодняшний день является наиболее эффективным способом их идентификации с целью защиты авторских прав селекционеров и сведению к минимуму фальсификации на рынке семян [4, 5].

Некоторые микросателлитные локусы играют роль в цитофизиологии эукариот, им отводится функция регуляторных участков, контролирующих экспрессию генов. Известно, что SSRs-локусы в пределах генома являются своеобразными метками того или иного признака. Это свойство объясняется тем, что для большинства подобных последовательностей характерно расположение рядом с геном, который опосредует связанный признак, что особенно удобно для картирования геномов различных сортов. Локусы, отвечающие за проявление количественного признака, называются QTLs. Они, как правило, и ассоциированы с SSRs-локусами, что дает возможность предположить наличие взаимосвязи между последовательностями микросателлитов и самим геном. Данных о влиянии SSRs-локусов сои на регуляцию генов и, как следствие, на фенотип на данный момент нет [6–8].

Поиск ассоциаций SSR-локусов с полезными признаками является важной задачей геномики, поскольку эти локусы позволяют отслеживать сцепленные с ними гены. Для сложных признаков частым явлением становится полигенная представленность в геноме. Для упрощения процесса отбора оценивают именно сами микросателлитные маркеры как наиболее удобные для детекции [9, 10].

Таким образом, простые повторяющиеся последовательности могут использоваться не только для паспортизации и идентификации различных сортов, но и как самостоятельные маркеры для селекционного отбора, в случае если будут выяснены конкретные механизмы ассоциации с проявлением хозяйственно-ценных признаков.

Не существует однозначного ответа о наличии взаимосвязи между длиной или последовательностью нуклеотидов в SSR-локусах и проявлением того или иного признака. Как правило, длина SSR-локуса не влияет напрямую на проявление признаков у растений. Однако возможно, что длина SSR-локуса может влиять на реализацию сложных признаков посредством появления новых сайтов связывания транскрипционных факторов, индуцированных инсерциями и делециями [11–16].

Цель исследований – поиск и оценка силы корреляции между длиной микросателлитных локусов и хозяйственно-ценными признаками.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования послужили 18 сортов селекции Всероссийского научно-исследовательского института сои: Кружевница, Умка, Лидия, Веретейка, Даурия, Золушка, Лазурная, Топаз, Сентябринка, Грэй, ВНИИС-18, Алпетра, Золотница, Апис, Лучистая, Тисей, Пепелина, Чародейка.

Для проведения опыта по маркированию генетических систем сортов культурной сои семена первоначально проращивали согласно ГОСТ 12044-93 в рулонах фильтровальной бумаги в течение семи суток при комнатной температуре. Проростки сои хранили при температуре минус 18 °С до проведения исследований. Выделение и очистка суммарной ДНК были выполнены с использованием набора реагентов для «ДНК-Экстран» (ООО «Синтол», Россия) с целью выделения геномной ДНК из растений. Концентрации двухцепочечной ДНК измеряли на флюориметре MAXLIFE (ООО «МВМ-Диагностик», Россия) согласно инструкции по применению к набору Test dsDNA-100. По результатам данного этапа перед проведением амплификации концентрацию образцов выделенной ДНК разбавляли до 100 нг/мкл.

Для амплификации выделенной ДНК применяли 15 пар SSR-праймеров, предложенных ранее авторами из ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур» в качестве маркерной системы для идентификации и паспортизации сортов культурной сои[1]. ПЦР проведена в 3-х аналитических

повторах с использованием представленных 15 пар SSR-праймеров [17].

ПЦР осуществляли в финальном объеме реакционной смеси 25 мкл, которая включала в себя 12,5 мкл готовой реакционной смеси «БиоМастер» HS-Taq ПЦР-Color (2×) (ООО «Биолабмикс», Россия), содержащей 100 мМ Трис-HCl, pH=8,5 (при 25 °С), 100 мМ KCl, 0,4 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 мМ $MgCl^2$, 0,06 ед. акт/мкл Taq ДНК-полимеразы, 0,2% Tween 20, стабилизаторы HS-Taq ДНК-полимеразы и красители; 10 нг образца выделенной ДНК; по 10 пМ прямого и обратного праймеров; 9,5 мкл стерильной воды. Амплификацию выделенных фрагментов ДНК сои проводили с помощью амплификатора CFX96 (Real-time) (Bio-Rad laboratories Inc., США) при следующих температурных режимах: начальная денатурация – при 96 °С в течение 2 мин, затем 32 цикла при температурно-временном режиме: денатурация – при 94 °С в течение 30 сек, отжиг праймера при температуре 45–60 °С (в зависимости от праймера) в течение 40 сек, элонгация – при температуре 70 °С в течение 1 мин; финальная элонгация – при температуре 70 °С в течение 2 мин. Для каждой из представленных пар праймеров была рассчитана температура отжига (в веб-версии программы PrimerBLAST)[2] [18] и была проведена их оптимизация экспериментальным путем. Для этого с каждой парой праймеров проводили ПЦР, где ДНК образцов сои амплифицировали по установленному протоколу, изменяя температуру отжига в каждом опыте на 3–5 °С. Выбор оптимального значения температуры отжига основывался на получении четких, хорошо различимых амплифицированных фрагментов в характерном для каждого локуса диапазоне количества п.н.

Продукты реакции были разделены методом электрофореза в 2%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, в 0,5×TBE с использованием камеры для горизонтального электрофореза SE-1 (ООО «Компания Хеликон», Россия) в течение 1,5–2 ч при силе тока 50 мА и напряжении 90–100 В. Визуализация осуществлена путем облучения геля ультрафиолетом с использованием гель-документирующей системы GelDoc EZ (Bio-Rad laboratories Inc., США). Идентификацию и определение размеров аллелей микросателлитных локусов проводили с использованием программы Image Lab Version 6.0.14 Standard Edition. Выявленные по каждому локусу аллели обозначали цифрами через запятую: аллель с максимальным значением молекулярной массы обозначали цифрой 1, далее по мере его уменьшения – цифрами 2, 3, 4.

Поиск ассоциированных с SSRs-маркерами генов QTLs проводили по базам данных soybase[3], NCBI[4] с помощью инструментария List of QTL, List of Traits, BLAST.

Анализ взаимосвязи длин локусов и хозяйственно-ценных признаков осуществляли с помощью расчета коэффициента взаимной сопряженности Пирсона [19]. Для интерпретации результатов корреляционного анализа воспользовались таблицей Чеддока (табл. 1).

Таблица 1. Сила корреляционной связи

Table 1. Strength of the correlation

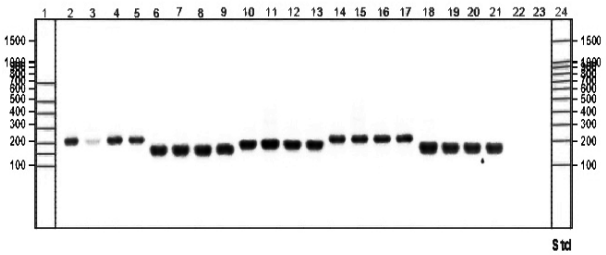
Абсолютное значение r_{xy}	Теснота (сила) корреляционной связи
менее 0,3	слабая
от 0,3 до 0,5	умеренная
от 0,5 до 0,7	заметная
от 0,7 до 0,9	высокая
более 0,9	весьма высокая

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из исследуемых 15 пар праймеров те, что фланкировали локусы *Soyprp1*, *Soygy2*, *Sat_1*, *Sat_43*, *Sat_36* и *138ct04*, не гибридизировались с матричной ДНК (табл. 2).

Невозможность гибридизации некоторых праймеров с их мишенями объясняется неточностью и устаревшим протоколом для предоставленных праймеров в литературе1 по сравнению с более современными из soybase для аналогичных локусов (табл. 3).

Таким образом, из 15 микросателлитных локусов полностью пригодными для идентификации и паспортизации имеющихся генотипов сои оказались только 8 и 1 частично (*Sat_263*). На основании биоинформационного анализа баз данных NCBI и soybase использование локусов *Soygy2* на данный момент не рекомендовано с целью паспортизации ввиду отсутствия их апробации с биоинформатических баз данных и получения противоречивых результатов. Маркеры *138ct04*, *Sat_263* стоит применять с осторожностью ввиду низкой валидации фланкирующих участков для этих локусов. Использование маркеров типа *Sat1/Sat43* рекомендуется с учетом обновленных версий праймеров по литературным источникам, имеющимся на soybase. На рисунке показана электрофореграмма результатов амплификации ДНК некоторых сортов сои по локусу *Satt9*.



Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК сортов сои по локусу Satt9. Дорожки 2-21 – фрагменты ДНК сортов (2-5 – Кружевница, 6-9 – Умка, 10-13 – Лидия, 14-17 – Веретейка, 18-21 –Даурия); 22-23 – отрицательный контроль (-ДНК); 1, 24 – маркер молекулярных весов (DNA Ladder, 100+ bp)

Electrophoregram of DNA amplification products of soybean varieties at the Satt9 locus. Lanes 2-21 are DNA fragments of varieties (2-5 – Lacemaker, 6-9 – Umka, 10-13 – Lydia, 14-17 – Vereteyka, 18-21 – Dauria); 22-23 – negative control (-DNA); 1, 24 – molecular weight marker (DNA Ladder, 100+ bp)

[1]Рамазанова С.А. Идентификация сортов сои с использованием молекулярно-генетических методов: дис. ... канд. биол. наук. Краснодар, 2008. 107 с. EDN: NQFMYT.

[2]Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST) // National Library of Medicine [Электронный ресурс]. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ (06.07.2023).

[3]SoyBase. Integrating Genetics and Genomics to Advance Soybean Research [Электронный ресурс]. URL: https://soybase.org/ (06.07.2023).

[4]National Library of Medicine [Электронный ресурс]. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ (06.07.2023).

Таблица 2. Длины микросателлитов различных сортов

Table 2. Microsatellites lengths of different varieties

Наименование сорта	Наименование локуса, размер продуктов амплификации (п.н.)								
	Satt1	*Satt2*	*Satt5*	*Satt9*	*Soyhsp176*	*Satt681*	*Sat_263*	*Satt141*	*Satt181*
Кружевница	137	154	150	206	115	244	135	148	225
Умка	137	154	136	159	115	244	135	187	225
Лидия	137	154	150	186	115	244	135	187	208
Веретейка	137	154	150	212	115	244	135	187	225
Даурия	145	154	150	168	115	244	135	187	218
Золушка	154	154	160	176	115	244	135	210	208
Лазурная	145	154	150	154	115	244	135	210	185
Топаз	145	154	136	138	115	244	135	210	170
Сентябринка	145	154	136	200	115	244	135	210	208
Грэй	137	146	160	186	115	244	165	210	218
ВНИИС-18	145	146	160	186	115	244	156	210	208
Алпетра	145	146	160	186	115	244	165	210	208
Золотница	137	154	160	212	115	244	156	210	170
Апис	125	154	160	212	115	244	156	210	208
Лучистая	125	146	160	212	120	244	156	210	208
Тисей	125	146	160	206	115	244	180	210	208
Пепелина	137	154	160	168	115	244	156	210	208
Чародейка	154	163	160	186	115	200	165	210	208

Таблица 3. Характеристика исследованных микросателлитных локусов

Table 3. Characteristics of the studied microsatellite loci

Локусы	Последовательность использованных праймеров в литературе	Последовательность праймеров по soybase
Sat_1	f-CTGGTGGACTATTGATACGACC r-AACTGCGAAGATACTACCCTCC	f-GCGGATACGACCAAAAATTGTT r-GCGAACTGCGAAGATACTACCC
Sat_43	f-AAATTCTGTTCATTGTCCGTC r-CATTTTAATATCCCGAGTAGG	f-GCGGTCCGTCAATGAATATTAAATTAAAA r-GCGAAAGCGGCAGAGAGAGAAAGGT
Soygy2	f-AAAATTGAAAGTGTCACACCCC r-TTAAAATCGATTAATTGGCATGA	В данный момент отсутствует в базах данных SSRs (soybase), nucleotide (NCBI)
138ct04	f-ACAATTTATTATTGTGCACGC r-ATTGTGCGCGTGTATGCG	Имеется как SSR-маркер, но не предоставлены праймеры (soybase)
Sat_263	f-GCGGTCGATCGTTTCAATTAGTATG r-GCGCTGGCAGCCCTTTATTATC	Имеется как SSR-маркер, но не предоставлены праймеры (soybase)
Soyprp1	f-CGAAGAGCTACGTGCCAAATT r-GTTAGAAAACTCCGCCCACAC	f-CGTGCCAAATTACATCA r-TGATGGGAACAAGTACATAA
Sat_36	f-AAAGTCATAACTGGCACTCCAAGTTT r-GAACATAACAATAATAAATATAGCTC	f-GCGACTCCAAGTTTTTTTTGTTT r-GCGGGAGTTAGAGGAAGAGAACA

Таблица 4. Локусы SSRs и их ассоциации с QTL (исследуемые признаки сои подчеркнуты)

Table 4. Loci of SSRs and their associations with QTL (soybean traits studied are underlined)

Локус	Ассоциированные QTLs	Локус	Ассоциированные QTLs
Satt1	Seed oil 37-10 Seed protein 33-3 Seed yield 29-1	*Satt181*	Hypocotyl weight 1-2 Pubescence density 1-2 Pubescence density 3-2 Pubescence length 1-2 Seed daidzein 2-2 Seed genistein 2-6 Seed glycitein 2-8 Seed isoflavone 1-3 Seed set 5-27 Seed tocopherol, alpha 3-3 Seed tocopherol, total 3-5 Seed weight 34-4
Satt2	Canopy wilt 1-3 Seed height 1-8 Seed Leu 1-3 Seed linoleic 6-6 Seed Met plus Cys 1-1 Seed weight 18-2 Seed weight 49-10 Seed yield 21-6 Seed yield 5-2		
Satt5	Lodging 27-5 Phytoph 6-2 Plant height 35-5 Pod maturity 28-1 Seed oil 38-3 Seed yield 28-10	*Soyhsp176*	Canopy width 1-2 Plant height 11-3 Plant height 7-2 Seed abortion 1-3
Satt9	Fe effic 3-4 Flower number 1-2 Japanese beetle resistance 1-8 Phytoph 14-5 Sclero 2-21 Sclero 3-15 Sclero 4-9 Sclero 5-13 Sclero 6-10 Seed isoflavone 4-2 Seed linolenic 14-6 Seed oil 24-5 Seed oil 39-14 Seed stearic 8-5	*Soyprp1*	На данный момент этому локусу не присвоено наличие каких-либо ассоциаций
		Satt681	Canopy wilt 3-6 Seed glycinin 2-4
Satt141	Corn earworm 9-1 First flower 13-3 Internode length 2-9 Leaflet shape 6-5 Pod wall to Pod weight ratio 1-3	*Sat_263*	На данный момент этому локусу не присвоено наличие каких-либо ассоциаций

Таблица 5. Хозяйственно-ценные признаки исследуемых сортов

Table 5. Economically valuable traits of the studied varieties

Название сорта	Высота растений, см	Масса 1000 семян, г	Потенциальная урожайность, т/га
Кружевница	62–68	115–145	2,93
Сентябринка	52–61	132–157	3,15
Веретейка	66–79	123–140	2,95
Лидия	57–90	158–168	3,05
Умка	65–95	170–198	3,84
Даурия	50–80	182–214	3,64
Золушка	71–81	151–177	3,28
Лазурная	60–90	163–203	3,64
Топаз	44–62	140–177	2,63
Грэй	76–91	142–145	3,42
ВНИИС-18	72–87	133–145	4,02
Алпетра	65–85	153–156	2,92
Золотница	56–63	145–170	3,02
Апис	62–81	145–165	3,05
Лучистая	72–85	125–149	3,12
Тисей	82–104	134–144	3,45
Пепелина	59–68	142–154	3,28
Чародейка	70–88	179–217	2,89

Таблица 6. Корреляция между признаком и длиной локуса

Table 6. Correlation between trait and locus length

Наименование признака	Наименование локуса, размер продуктов амплификации (п.н.)								
	Satt1	*Satt2*	*Satt5*	*Satt9*	*Soyhsp176*	*Satt681*	*Sat_263*	*Satt141*	*Satt181*
Высота растений, см	-0,255	-0,422	0,485	0,204	0,153	-0,165	0,551	0,147	0,435
Масса 1000 семян, г	0,561	0,562	0,028	-0,453	-0,222	-0,527	-0,114	0,202	-0,281
Потенциальная урожайность	0,009	-0,321	0,035	-0,233	-0,080	0,236	0,015	0,067	0,278

Биоинформатический поиск ассоциаций указал, что приведенные маркеры могут быть использованы для генотипирования определенных качеств, которые сцеплены с находящимися рядом участками, так называемыми QTLs (табл. 4).

Следующим шагом были отобраны хозяйственно-ценные признаки, с которыми имеется QTL-ассоциация исследованных SSR-локусов. В результате анализа было отобрано 3 признака: высота растений, масса 1000 семян, потенциальная урожайность (табл. 5) [20].

После того как были отобраны подходящие хозяйственно-ценные признаки, был проведен корреляционный анализ между длинами ампликонов, полученных после проведения ПЦР, и показателями хозяйственно-ценных признаков (табл. 6).

Была выявлена прямая взаимосвязь высоты растений с локусами *Satt5* (умеренная), *Satt181* (умеренная), *Sat_263* (заметная), а также обратная зависимость с *Satt2* (умеренная). Масса 1000 семян имела прямую корреляцию с *Satt1* (заметная), *Satt2* (заметная) и обратную корреляцию с *Satt9* (умеренная) и *Satt681* (заметная). Потенциальная урожайность имела обратную корреляцию с *Satt2* (умеренная). Разнонаправленная корреляции *Satt2* с разными признаками объясняется тем, что урожайность и высота растений могут быть взаимоисключающими показателями, при высокой урожайности и высоте растения теряется масса семян.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было обнаружено, что *Satt1*, *Satt2*, *Satt5*, *Satt9*, *Satt681*, *Sat_263*, *Satt181* имеют некоторую связь с каким-либо признаком, *Satt2* же имеет связь сразу с тремя, показывая прямую корреляцию с массой семян и отрицательную с высотой растения и урожайностью. Это свидетельствует о том, что микросателлиты могут проявлять себя как маркер определенного признака или же они имеют некую регуляторную функцию и способны увеличивать или уменьшать экспрессию определенных генов, для подтверждения или опровержения чего требуется более детальный и трудоемкий их анализ с помощью chip-seq-технологии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sudaric A., Vratarić M., Mladenović-Drinić S., Matosa M. Biotechnology in soybean breeding // Genetika. 2010. Vol. 42, no. 1. P. 91–102. https://doi.org/10.2298/gensr1001091s.

2. Singh G., Dukariya G., Kumar A. Distribution, importance and diseases of soybean and common bean: a review // Biotechnology Journal International. 2020. Vol. 24, no. 6. P. 86–98. https://doi.org/10.9734/bji/2020/v24i630125.

3. Bakhsh A., Sırel I.A., Kaya R.B., Ataman I.H., Tillaboeva Sh., Dönmez B.A., et al. Contribution of genetically modified crops in agricultural production: success stories. In: Policy Issues in Genetically Modified Crops. Academic Press, 2021. P. 111–142. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820780-2.00006-6.

4. Hwang S., Lee T.G. Integration of lodging resistance QTL in soybean // Scientific Reports. 2019. Vol. 9. P. 6540. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42965-6.

5. Achard F., Butruille M., Madjarac S., Nelson P.T., Duesing J., Laffont J-L., et al. Single nucleotide polymorphisms facilitate distinctness–uniformity–stability testing of soybean cultivars for plant variety protection // Crop Science. 2020. Vol. 60, no. 5. P. 2280–2303. https://doi.org/10.1002/csc2.20201.

6. Tiwari S., Tripathi N., Tsuji K., Tantwai K. Genetic diversity and population structure of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) as revealed by microsatellite markers // Physiology and Molecular Biology of Plants. 2019. Vol. 25, no. 4. P. 953–964. https://doi.org/10.1007/s12298-019-00682-4.

7. Vieira M.L.C., Santini L., Diniz A.L., de Freitas Munhoz C. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful // Genetics and Molecular Biology. 2016. Vol. 39, no. 3. https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.

8. Wang H., Campbell B., Happ M., McConaughy S., Lorenz A., Amundsen K., et al. Development of molecular inversion probes for soybean progeny genomic selection genotyping // bioRxiv. 2022. https://doi.org/10.1101/2022.05.03.490091.

9. Daware A., Das S., Srivastava R., Badoni S., Singh A.K., Agarwal P., et al. An efficient strategy combining SSR markers- and advanced QTL-seq-driven QTL mapping unravels candidate genes regulating grain weight in rice // Frontiers in Plant Science. 2016. Vol. 7. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01535.

10. Zatybekov A.K., Turuspekov Y.T., Doszhanova B.N., Abugalieva S.I. A study of the genetic diversity in the world soybean collection using microsatellite markers associated with fungal disease resistance // Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2020. Vol. 181, no. 3. P. 81–90. https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-3-81-90.

11. Майер Н.К., Крупин П.Ю., Пыльнев В.В., Рубец В.С., Коршунов А.В., Дивашук М.Г. Анализ полиморфизма SSR-маркеров, сцепленных с QTL-локусами устойчивости к прорастанию на корню у тритикале // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2011. N 6. С. 144–149. EDN: OOLONX.

12. Bocianowski J., Nowosad K., Wróbel B., Szulc P. Identification of associations between SSR markers and quantitative traits of maize (*Zea mays* L.) // Agronomy. 2021. Vol. 11, no. 1. P. 182. https://doi.org/10.3390/agronomy11010182.

13. Fliege C.E., Ward R.A., Vogel P., Nguyen H., Quach T., Guo M., et al. Fine mapping and cloning of the major seed protein quantitative trait loci on soybean chromosome 20 // The Plant Journal. 2022. Vol. 110, no. 1. P. 114–128. https://doi.org/10.1111/tpj.15658.

14. Chen Ch., Chen Y., Huang W., Jiang Y., Zhang H., Wu W. Mining of simple sequence repeats (SSRs) loci and development of novel transferability-across EST-SSR markers from *de novo* transcriptome assembly of *Angelica Dahurica* // PLOS ONE. 2019. Vol. 14, no. 8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221040.

15. Ott A., Trautschold B., Sandhu D. Using microsatellites to understand the physical distribution of recombination on soybean chromosomes // PLOS ONE. 2011. Vol. 6, no. 7. P. e22306. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022306.

16. Sun M., Jing Y., Zhao X., Teng W., Qiu L., Zheng H., et al. Genome-wide association study of partial resistance to sclerotinia stem rot of cultivated soybean based on the detached leaf method // PLOS ONE. 2020. Vol. 15, no. 5. P. e0233366. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233366 .

17. Рябушкина Н.А., Омашева М.Е., Галиакпаров Н.Н. Специфика выделения ДНК из растительных объектов // Биотехнология. Теория и практика. 2012. N 2. С. 9–26. https://doi.org/10.11134/btp.2.2012.1. EDN: VKUFWV.

18. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // BMC Bioinformatics. 2012. Vol. 13, no. 1. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134.

19. Das D., Das A. Statistics in biology & psychology. Academic Publishers, 1980. 351 p.

20. Присяжная И., Присяжная С., Липкань А., Сахаров В., Усанов В. Исследование посевных качеств семян сои в семеноводческих хозяйствах Амурской области // Journal of Agriculture and Environment. 2021. Т. 19. N 3. https://doi.org/10.23649/jae.2021.3.19.4.

REFERENCES

1. Sudaric A., Vratarić M., Mladenović-Drinić S., Matosa M. Biotechnology in soybean breeding. *Genetika.* 2010;42(1):91-102.
https://doi.org/10.2298/gensr1001091s.

2. Singh G., Dukariya G., Kumar A. Distribution, importance and diseases of soybean and common bean: a review. *Biotechnology Journal International.* 2020;24(6):86-98.
https://doi.org/10.9734/bji/2020/v24i630125.

3. Bakhsh A., Sırel I.A., Kaya R.B., Ataman I.H., Tillaboeva Sh., Dönmez B.A., et al. Contribution of genetically modified crops in agricultural production: success stories. In: *Policy Issues in Genetically Modified Crops.* Academic Press; 2021, p. 111-142.
https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820780-2.00006-6.

4. Hwang S., Lee T.G. Integration of lodging resistance QTL in soybean. *Scientific Reports.* 2019;(9):6540.
https://doi.org/10.1038/s41598-019-42965-6.

5. Achard F., Butruille M., Madjarac S., Nelson P.T., Duesing J., Laffont J-L., et al. Single nucleotide polymorphisms facilitate distinctness–uniformity–stability testing of soybean cultivars for plant variety protection. *Crop Science.* 2020;60(5):2280-2303.
https://doi.org/10.1002/csc2.20201.

6. Tiwari S., Tripathi N., Tsuji K., Tantwai K. Genetic diversity and population structure of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) as revealed by microsatellite markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants.* 2019;25(4):953-964.
https://doi.org/10.1007/s12298-019-00682-4.

7. Vieira M.L.C., Santini L., Diniz A.L., de Freitas Munhoz C. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology.* 2016;39(3).
https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.

8. Wang H., Campbell B., Happ M., McConaughy S., Lorenz A., Amundsen K., et al. Development of molecular inversion probes for soybean progeny genomic selection genotyping. *bioRxiv.* 2022.
https://doi.org/10.1101/2022.05.03.490091.

9. Daware A., Das S., Srivastava R., Badoni S., Singh A.K., Agarwal P., et al. An efficient strategy combining SSR markers- and advanced QTL-seq-driven QTL mapping unravels candidate genes regulating grain weight in rice. *Frontiers in Plant Science.* 2016;7.
https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01535.

10. Zatybekov A.K., Turuspekov Y.T., Doszhanova B.N., Abugalieva S.I. A study of the genetic diversity in the world soybean collection using microsatellite markers associated with fungal disease resistance. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding.* 2020;181(3):81-90.
https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-3-81-90.

11. Maier N.K., Krupin P.Yu., Pyl'nev V.V., Rubets V.S., Korshunov A.V., Divashuk M.G. Analysis of polymorphism of SSR markers linked to QTL loci, resistance to germination on the root of triticale. *Izvestiya Timiryazevskoi sel'skokhozyaistvennoi akademii = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy.* 2011;(6):144-149. (In Russian). EDN: OOLONX.

12. Bocianowski J., Nowosad K., Wróbel B., Szulc P. Identification of associations between SSR markers and quantitative traits of maize (*Zea mays* L.). *Agronomy.* 2021;11(1):182.
https://doi.org/10.3390/agronomy11010182.

13. Fliege C.E., Ward R.A., Vogel P., Nguyen H., Quach T., Guo M., et al. Fine mapping and cloning of the major seed protein quantitative trait loci on soybean chromosome 20. *The Plant Journal.* 2022;110(1):114-128.
https://doi.org/10.1111/tpj.15658.

14. Chen Ch., Chen Y., Huang W., Jiang Y., Zhang H., Wu W. Mining of simple sequence repeats (SSRs) loci and development of novel transferability-across EST-SSR markers from *de novo* transcriptome assembly of *Angelica Dahurica*. *PLOS ONE.* 2019;14(8).
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221040.

15. Ott A., Trautschold B., Sandhu D. Using microsatellites to understand the physical distribution of recombination on soybean chromosomes. *PLOS ONE.* 2011;6(7):e22306.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022306.

16. Sun M., Jing Y., Zhao X., Teng W., Qiu L., Zheng H., et al. Genome-wide association study of partial resistance to sclerotinia stem rot of cultivated soybean based on the detached leaf method. *PLOS ONE.* 2020;15(5):e0233366.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233366.

17. Ryabushkina N.A., Omasheva M.E., Galiakparov N.N. Specifics of DNA extraction from plant objects. *Biotekhnologiya. Teoriya i praktika = Eurasian Journal of Applied Biotechnology.* 2012;(2):9-26. (In Russian).
https://doi.org/10.11134/btp.2.2012.1. EDN: VKUFWV.

18. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13(1).
https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134.

19. Das D., Das A. *Statistics in biology & psychology*. Academic Publishers; 1980. 351 p.

20. Prisyazhnaya I., Prisyazhnaya S., Lipkan' A., Sakharov V., Usanov V. Study of sowing qualities of soybean seeds in seed farms of Amur region. *Journal of Agriculture and Environment.* 2021;19(3). (In Russian).
https://doi.org/10.23649/jae.2021.3.19.4.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Бондаренко Ольга Николаевна,
научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт сои,
675000, г. Благовещенск,
Игнатьевское шоссе, 19,
Российская Федерация,
✉ton@vniisoi.ru
https://orcid.org/0000-0002-5051-7695

Тимкин Павел Дмитриевич,
младший научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт сои,
675000, г. Благовещенск,
Игнатьевское шоссе, 19,
Российская Федерация,
tpd@vniisoi.ru
https://orcid.org/0000-0001-6655-1049

Блинова Анастасия Андреевна,
младший научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт сои,
675000, г. Благовещенск,
Игнатьевское шоссе, 19,
Российская Федерация,
baa@vniisoi.ru
https://orcid.org/0000-0002-7234-0595

Иваченко Любовь Егоровна,
д.б.н., ведущий научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт сои,
675000, г. Благовещенск,
Игнатьевское шоссе, 19,
Российская Федерация,
ivachenko-rog@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0003-4870-2223

Пензин Андрей Андреевич,
младший научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт сои,
675000, г. Благовещенск,
Игнатьевское шоссе, 19,
Российская Федерация,
paa@vniisoi.ru
https://orcid.org/0000-0002-8578-9818

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 01.03.2023.
Одобрена после рецензирования .08.06.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ol'ga N. Bondarenko,
Researcher,
All-Russian Scientific Research Institute of Soybean,
19, Ignatievsky Highway, Blagoveshchensk, 675000,
Russian Federation,
✉ton@vniisoi.ru
https://orcid.org/0000-0002-5051-7695

Pavel D. Timkin,
Junior Researcher,
All-Russian Scientific Research Institute of Soybean,
19, Ignatievsky Highway, Blagoveshchensk, 675000,
Russian Federation,
tpd@vniisoi.ru
https://orcid.org/0000-0001-6655-1049

Anastasia A. Blinova,
Junior Researcher,
All-Russian Scientific Research Institute of Soybean,
19, Ignatievsky Highway, Blagoveshchensk, 675000,
Russian Federation,
baa@vniisoi.ru
https://orcid.org/0000-0002-7234-0595

Lyubov E. Ivachenko,
Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher,
All-Russian Scientific Research Institute of Soybean,
19, Ignatievsky Highway, Blagoveshchensk, 675000,
Russian Federation,
ivachenko-rog@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0003-4870-2223

Andrey A. Penzin,
Junior Researcher,
All-Russian Scientific Research Institute of Soybean,
19, Ignatievsky Highway, Blagoveshchensk, 675000,
Russian Federation,
paa@vniisoi.ru
https://orcid.org/0000-0002-8578-9818

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 01.03.2023.
Approved after reviewing 08.06.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 577.13:577.19
EDN: PQNFQN
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-434-441

Повышение устойчивости культуры клеток *Arabidopsis thaliana* к фториду натрия за счет конститутивной экспрессии HSP101

Е.Л. Горбылева*✉, М.А. Сафонова, А.В. Степанов*, Е.Г. Рихванов***

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

***Байкальский гуманитарный институт, г. Иркутск, Российская Федерация*

Аннотация. *Фтор является одним из токсических компонентов выбросов промышленных предприятий. Повышенное содержание фтора в атмосфере, почве или воде негативно влияет на рост и развитие растений, а также снижает устойчивость к различным стрессовым факторам окружающей среды. Увеличение температуры окружающей среды вызывает у всех организмов защитный ответ в виде синтеза белков теплового шока. У растений имеется специфический белок HSP101, который выполняет функцию защиты клеток от тепловых повреждений и также является ответственным за индуцируемую термотолерантность – способность организмов выдерживать воздействие жесткого теплового шока, будучи предварительно подвергнутыми действию мягкого теплового стресса, в результате которого индуцируются белки теплового шока. Известно, что белки теплового шока участвуют в защите не только от повышенных температур, но и от других различных стрессовых факторов. В настоящей работе было изучено влияние обработки фторидом натрия на жизнеспособность культуры клеток Arabidopsis thaliana, экспрессию и синтез белков теплового шока, а также роль белка теплового шока HSP101 в устойчивости к фтору. Показано, что фторид натрия значительно снижает жизнеспособность клеток A. thaliana, подавляет активацию экспрессии гена HSP101 при повышении температуры. В то же время линия A. thaliana с конститутивной экспрессией гена HSP101 оказалась более устойчива к токсичному действию фторида натрия.*

Ключевые слова: *фторид натрия, Arabidopsis thaliana, белки теплового шока, культура клеток, тепловой стресс*

Благодарности. *Авторы выражают благодарность ведущему инженеру Т.М. Русалевой за помощь в выделении белка и проведении иммуноблоттинга с антителами, а также профессору Е. Виерлингу и доктору М. Эскобару (Университет Аризоны, США) за предоставленные антитела к Hsp101 и Hsp17.6 (класс I и II). Работа выполнена с использованием коллекции Центра коллективного пользования (ЦКП) «Биоресурсный центр» и оборудования ЦКП «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).*

Для цитирования: Горбылева Е.Л., Сафонова М.А., Степанов А.В., Рихванов Е.Г. Повышение устойчивости культуры клеток *Arabidopsis thaliana* к фториду натрия за счет конститутивной экспрессии HSP101 // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 434–441. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-434-441. EDN: PQNFQN.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Increased *Arabidopsis thaliana* cell culture resistance to sodium fluoride by constitutive expression of HSP101

Elena L. Gorbyleva*✉, Mariya A. Safonova, Alexey V. Stepanov*, Evgenii G. Rikhvanov***

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

***Baikal Humanitarian Institute, Irkutsk, Russian Federation*

Abstract. *Fluorine is one of the toxic elemental components of industrial emissions. Increased fluoride content in the atmosphere, soil or water negatively affects the growth and development of plants, as well as reducing resistance to various environmental stressors. An increase in ambient temperature causes a protective response in all organisms taking the form heat shock protein synthesis. The specific protein HSP101, which performs the function of protecting plant cells from heat damage, is also responsible for inducible thermotolerance, representing the ability of organisms to withstand the effects of severe heat shock that were previously exposed to mild heat stress, as a result of which heat shock proteins are induced. Heat shock proteins are involved in protecting not only against*

© Горбылева Е.Л., Сафонова М.А., Степанов А.В., Рихванов Е.Г., 2023

elevated temperatures, but also various other stress factors. In this work, the effect of sodium fluoride treatment on the viability of Arabidopsis thaliana cell culture, expression and synthesis of heat shock proteins was studied along with the role of heat shock protein HSP101 in providing resistance to fluoride. Sodium fluoride has been shown to significantly reduce the viability of A. thaliana cells by suppressing the activation of HSP101 gene expression with an increase in temperature. At the same time, the A. thaliana line, which has constitutive expression of the HSP101 gene, proved to be more resistant to the toxic effects of sodium fluoride.

Keywords: *sodium fluoride, Arabidopsis thaliana, heat shock proteins, cell culture, heat stress*

Acknowledgements. *The authors are grateful leading ingeneer T.M. Rusaleva for the help in isolation protein fractions and immunoblotting with antibodies, and also to Dr. M. Escobar and Professor E. Vierling (University of Arizona, USA) for the gift of antibodies to Hsp101 and Hsp17.6 (class I and II). The study was carried out using the collection of the Central Collective Use Center "Bioresource Center" and the equipment of the "Bioanalytics Center" of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (Irkutsk).*

For citation: Gorbyleva E.L., Safonova M.A., Stepanov A.V., Rikhvanov E.G. Increased *Arabidopsis thaliana* cell culture resistance to sodium fluoride by constitutive expression of HSP101. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(3):434-441. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-434-441. EDN: PQNFQN.

ВВЕДЕНИЕ

Фтор – это двухатомный бесцветный газ с резким запахом, один из основных элементов атмосферных выбросов промышленных предприятий, которые специализируются на производстве алюминия, минеральных и фосфорных удобрений. Фтор является одним из главных загрязнителей в природе [1, 2]. Фтор не является необходимым питательным компонентом для роста и развития растений, поэтому он фитотоксичен [3]. Токсичность фтора также обусловлена его высокой реакционной способностью, что позволяет ему образовывать соединения с очень многими элементами периодической системы. Фтор – очень сильный окислитель, он участвует в образовании свободных радикалов, таких как гидроксил радикал ($OH^{\bullet}$), супероксид анион радикал ($O_2^{\bullet -}$), в образовании пероксида водорода (H_2O_2), появление которых приводит к клеточным повреждениям [1, 2].

В растения фтор попадает через атмосферу или через почву. При этом фториды обычно диссоциируют, и ионы фтора транспортируются в верхушку побега и запасающие органы, накапливаясь главным образом в листьях [2–4].

У растений, подверженных воздействию фторидов, в частности NaF, наблюдается разнообразный спектр повреждений: угнетение роста, апикальный некроз, хлороз, покраснение, деформация и увядание листьев, вплоть до их сбрасывания и полной гибели чувствительных видов. Фториды вызывали снижение хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов, увеличение содержания антоцианов [2, 4–8]. Обработки фторидами приводили также к увеличению активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы), изменению в уровне флавонов, фенолов, увеличению содержания аскорбиновой кислоты, глутатиона [2, 4, 9, 10]. Фтор даже в небольших количествах может нарушать гомеостаз растений, не вызывая при этом видимых повреждений [11]. Показано, что загрязнение фтором может снижать устойчивость растений к различного рода стрессовым факторам [12].

Наряду с антропогенным загрязнением окружающей среды химическими веществами, в частности фтором, в настоящее время происходит глобальное потепление климата. Засуха и повышение среднегодовой температуры являются одним из главных факторов снижения урожая. В связи с этим возникает вопрос, как скажется потепление климата на устойчивости растений в условиях загрязнения окружающей среды фторидами.

При повышении температуры окружающей среды у всех живых организмов начинается синтез белков теплового шока (БТШ) для защиты клеток от дальнейшего теплового повреждения. У растений эту функцию выполняет белок HSP101 [13, 14]. Показано также, что повышение количества БТШ происходит в ответ на действие различных стрессовых факторов, не связанных с температурой.

На основании вышеперечисленных данных было предположено, что увеличение количества БТШ приведет к повышению устойчивости растений к фтору. Поэтому целью работы являлось изучение токсичности NaF и его эффекта на синтез БТШ у *Arabidopsis thaliana*, а также с использованием линии с конститутивной экспрессией *HSP101* оценка того, как искусственное повышение количества HSP101 повлияет на устойчивость клеток *A. thaliana* к фторид-ионам.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы три культуры клеток *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn): клетки экотипа Columbia из 14-дневных проростков, две трансгенные по синтезу белка HSP101 культуры арабидопсиса расы Nössern, предоставленные Е. Виерлингом (Университет Аризоны, США): линия, где HSP101 синтезируется конститутивно (S), и линия, трансформированная пустым вектором (V). Культуры клеток выращивали 8 дней в темноте при температуре 26 °С в среде Мурасиге-Скуга с 3% сахарозы, 0,5 мг/мл пиридоксина, 0,5 мг/мл тиамина и 0,1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). В трансгенных линиях по синтезу HSP101 последовательность кДНК гена *HSP101 A. thaliana* экотипа Columbia находится под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты в смысловой и антисмысловой ориентации [15].

Химическую обработку клеток проводили путем добавления концентрированного раствора NaF. Клетки вместе с культуральной средой инкубировали в пробирках 3, 6 и 24 ч на минитермошейкере TS-100 (BioSan, Латвия) или в колбах на водяном термошейкере Elpan 357 (Elpan, Польша).

Выживаемость клеток арабидопсиса экотипа Columbia определяли по восстановлению 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ). Культуру клеток ресуспендировали в фосфатном буфере и окрашивали 0,05%-м ТТХ в течение 3 ч при комнатной температуре в темноте.

Формазан экстрагировали 95%-м этанолом в течение 15 мин при температуре 60 °С. Далее раствор формазана фотометрировали при длине волны 490 нм на фотоэлектроколориметре КФК-2-УХЛ 4.2 (АО «Загорский оптико-механический завод», Россия), экстинкцию рассчитывали на 1 г сырого веса [16].

ОТ-ПЦР-анализ был выполнен следующим образом: выделяли суммарную РНК с использованием набора SV Total RNA Isolation System (Promega, США). Синтез первой цепи кДНК проводили с 1 мкг тотальной РНК, 20 рМ праймера oligo(dT)$_{18}$ и набора REVERTA (фирма «АмплиСенс», Россия). Далее 50 нг кДНК в качестве матрицы и 10 рМ каждого из геноспецифичных праймеров амплифицировали с помощью набора AmpliSense-200-1 (фирма «АмплиСенс», Россия) на амплификаторе Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf, Германия). Праймеры для *HSP101* (At1g74310), *HSP60* (At3g23990), *HSP17.6C-CII* (At5g56120) и *ACT2* (At3g18780) выбирали с помощью программы VectorNTI, используя кДНК последовательности нужных генов[1]. Схема амплификации: предварительный прогрев 3 мин при температуре 95 °С, циклы (95 °С – 40 с, 58 °С – 60 с, 72 °С – 90 с) и конечный прогрев 10 мин при температуре 72 °С. Количество циклов подбирали по результатам амплификации кДНК каждого гена для определения линейной области увеличения концентрации продукта амплификации. ПЦР-продукты разделяли в 1,5%-м агарозном геле. Результаты документировали с помощью УФ-трансиллюминатора ChemiDocXRS+ (Bio-Rad, США).

Выделение белка проводили путем ресуспендирования клеток в буфере с pH 7,4–7,6 следующего состава: 0,1 М Трис-HCl, 1 мМ *β*-меркаптоэтанол, 3 мМ додецилсульфат натрия (ДСН), посредством фиксирования жидким азотом и измельчения в ступке с кварцевым песком. Клеточные компоненты удаляли центрифугированием (15 000 *g*, 15 мин), белок осаждали 3-кратным объемом ацетона. Осадок белка трижды промывали ацетоном и растворяли в буфере для образца (0,625 М Трис-HCl, 8 мМ ДСН, 0,1 М *β*-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 0,001% бромфеноловый синий, pH 6,8). Концентрацию белка определяли по методу О.Х. Лоури с соавторами [17]. После разделения белков путем ДСН-электрофореза в 14%-м полиакриламидном геле проводили иммуноблоттинг с антителами против HSP60 (SPA-807; StressGen, США), HSP101 и HSP17.6 (оба предоставлены Е. Виерлингом, Университет Аризоны, США).

Микроскопический анализ клеток арабидопсиса расы Nössern проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 (Zeiss, Германия) с цифровой монохромной камерой AxioCam MRm3 (Carl Zeiss MicroImaging, Германия) и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изображений AxioVision Rel.4.6. Количество живых и мертвых клеток оценивали с помощью флуоресцентных красителей: 50 мкМ флуоресцеин диацетата (FDA) и 5 мкг/мл пропидий йодида (PI) соответственно. Красители добавляли в среду к клеткам суспензионной культуры и инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре. Далее исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа. Для статистического обсчета данных производили минимум 10 снимков каждой пробы. Результаты выражали в относительных единицах.

Все эксперименты проведены в 3–8 биологических повторностях. Полученные данные подвергали статистическому анализу: рассчитаны средние арифметические значения и их стандартные отклонения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Устойчивость растений к фторидам очень разнообразна [3, 18]. Некоторые растения могут выделять фтор в виде фторацетата и винилфторида, а такие растения, как чай, шпинат, капуста, салат, являются гипераккумуляторами фтора и могут накапливать без вреда для себя до 20–30 раз большие концентрации фтора, чем другие растения [4]. Галофит *Salicornia brachiata* Roxb. относительно устойчив к NaF в концентрации 50–100 мМ [19]. В то же время 2,5 мМ NaF подавлял рост каллуса лиственницы сибирской [20]. Стоит также отметить, что низкие концентрации фторида натрия стимулировали рост корней и побегов. Так, П. Пант и П. Бхиравамурти показали, что в ответ на 1 мМ NaF происходило увеличение роста корней пшеницы и побегов горчицы, а у нута – обоих этих показателей. Применение более высоких концентраций фторида натрия вызывало угнетение роста побегов и корней у всех изученных в данной работе видов [18].

В настоящей работе изучали влияние фторида натрия в концентрации 20 мМ на выживаемость культуры клеток *A. thaliana*. Клетки арабидопсиса экотипа Columbia инкубировали с NaF в течение 0, 3, 6 и 24 ч, затем определяли жизнеспособность по восстановлению ТТХ. Присутствие NaF привело к снижению жизнеспособности клеток в зависимости от времени обработки. Инкубация клеток в течение 24 ч с 20 мМ NaF снизила количество живых клеток до 34% относительно контроля (рис. 1).

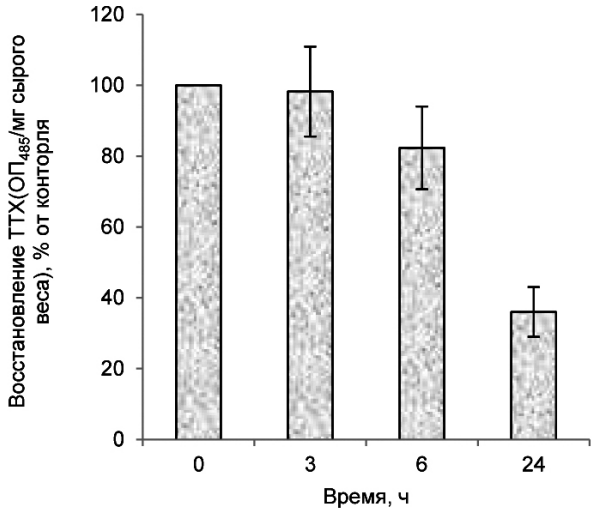


Рис. 1. Влияние NaF на жизнеспособность культуры клеток *A. thaliana*. Культуру клеток инкубировали с 20 мМ NaF. Восстановление трифенилтетразолий хлорида определяли через 0 (контрольные образцы), 3, 6 и 24 ч инкубации при температуре 26 °С. Данные выражены в процентах от контроля

Fig. 1. NaF effect on viability of *A. thaliana* cell culture. Cell culture was incubated with 20 mM NaF. Reduction of TTC was measured immediately (control samples) and after incubation for 3, 6 and 24 h at 26 °C Data are expressed as percentage relative to the control samples

[1]The Arabidopsis Information Resource [Электронный ресурс]. URL: https://www.arabidopsis.org/ (28.08.2023).

Таким образом, обработка в концентрации NaF 20 мМ приводит к сильному снижению жизнеспособности клеток *A. thaliana*. Эти данные подтверждают ранее полученные результаты [21], где было показано, что инкубация с 10 мМ NaF приводила к подавлению роста, однако на жизнеспособность практически не влияла, а увеличение концентрации до 20 мМ приводило к гибели культуры клеток *A. thaliana*. Что касается других видов растений, было показано, что концентрации 5 и 10 мМ NaF также вызывали значительное ингибирование роста побегов и корней таких растений, как нут, ячмень, редис, рожь, пшеница, люпин, подсолнечник, огурец, люцерна и томат [8].

В естественных условиях обитания растения зачастую одновременно подвергаются не одному стрессовому фактору, а двум и более. Далее было изучено влияние на экспрессию БТШ совместного действия повышенной температуры и NaF. БТШ синтезируются при мягком тепловом стрессе и защищают клетки от более высоких повреждающих температур. У растений белку HSP101 принадлежит одна из главных ролей в развитии термотолерантности [13, 14]. Показана защитная роль синтезируемых БТШ при воздействии таких стрессовых факторов, как аноксия [22], окислительный стресс, тяжелые металлы [23]. Также искусственное изменение уровня БТШ усиливало устойчивость растений к засолению, осмотическому стрессу [24] и к инфекции патогенными микроорганизмами [22, 23, 25].

Для тепловой индукции БТШ достаточно кратковременного инкубирования клеток в условиях повышенной температуры [13], поэтому для того чтобы изучить влияние фторида натрия на экспрессию генов БТШ, клетки *A. thaliana* инкубировали с 20 мМ NaF при температурах 26 и 37 °С в течение 2 ч и отбирали пробы для ОТ-ПЦР-анализа (рис. 2).

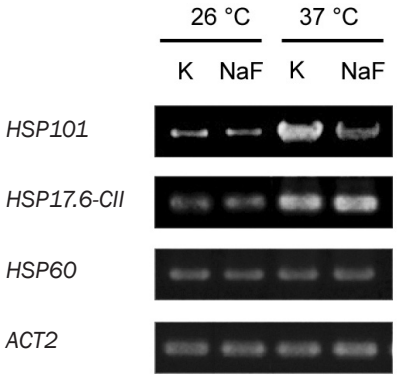


Рис. 2. Влияние NaF на экспрессию генов белков теплового шока в клетках *A. thaliana* в условиях мягкого теплового стресса. Представлены результаты ОТ-ПЦР генов *HSP101, HSP60* и *HSP17.6-CII*. Клетки инкубировали при температурах 26 и 37 °С 2 ч в отсутствии (контроль) или в присутствии 20 мМ NaF

Fig 2. Effect of NaF on *A. thaliana* cells HSPs gene expression at mild heat stress. Results of RT-PCR *HSP101*, *HSP60* and *HSP17.6-CII* genes are shown. Cells were incubated at 26 or 37 °C 2 h in the absence (control) or presence of 20 mM NaF

Как видно из рис. 2, при температуре 26 °С экспрессия генов *HSP101* и *HSP17.6-CII* была незначительной или вообще не наблюдалась. Обработка NaF не влияла на экспрессию генов БТШ при температуре 26 °С. Однако мягкий тепловой стресс (37 °С) заметно индуцировал экспрессию всех исследуемых генов, кроме *HSP60*. NaF в условиях теплового стресса подавлял тепловую индукцию гена *HSP101*, но не влиял на увеличение экспрессии низкомолекулярного БТШ *HSP17.6-CII*. Экспрессия контрольного гена «домашнего хозяйства» *ACT2* не менялась во всех пробах.

Для проверки предположения о защитной роли HSP101 при действии NaF использовали клетки дикого типа расы Columbia (WT), а также трансгенной линии арабидопсиса (раса Nössern), трансформированной вектором с геном *HSP101 A. thaliana* (линия S), и линии, трансформированной пустым вектором (линия V). Необходимо было подтвердить, что в линии S синтез белка HSP101 происходит конститутивно и не зависит от тепловой обработки. Влияние теплового стресса на культуры клеток анализировали с помощью вестерн-блоттинга с антителами против HSP101, HSP60, HSP17.6-CII. Клетки инкубировали в течение 2 ч при температурах 26 и 37°С и отбирали пробы для выделения белка и последующего иммуноблоттинга (рис. 3).

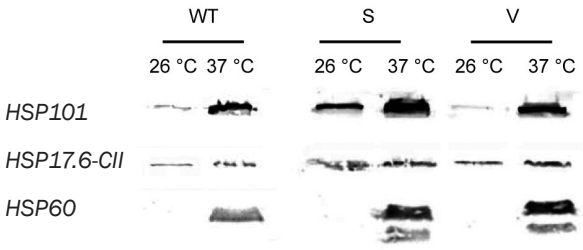


Рис. 3. Синтез белков теплового шока в клетках трансгенных линий *A. thaliana* в условиях мягкого теплового стресса. Представлен иммуноблоттинг с антителами против HSP101, HSP60 и HSP17.6 (класс II). Клетки инкубировали при температурах 26 или 37 °С в течение 2 ч. WT – клетки дикого типа; S – клетки линии с конститутивным синтезом HSP101; V – клетки линии, трансформированной пустым вектором

Fig. 3. *A. thaliana* transgenic cell lines HSPs synthesis at mild heat stress. Immunoblots with antibodies against HSP101, HSP60 and HSP17.6 (class II) are shown. Cells were incubated at 26 or 37 °C for 2 h. WT – wild type cells; S – cells with constitutive HSP101 level; V – cells transformed with empty vector

Результаты показали значительное повышение уровня БТШ в культуре клеток дикого типа *A. thaliana* (WT) в условиях мягкого теплового стресса. Влияние теплового стресса на клетки, содержащие контрольный вектор (линия V), было в точности таким же, как и у дикого типа. Как и ожидалось, в линии S в отсутствии теплового воздействия наблюдался значительный уровень синтеза HSP101 в контрольных условиях, а при мягком тепловом стрессе он несколько увеличивался за счет индукции синтеза собственного белка. Синтез HSP60 практически не менялся при любых условиях эксперимента. Синтез HSP17.6-CII увеличивался при

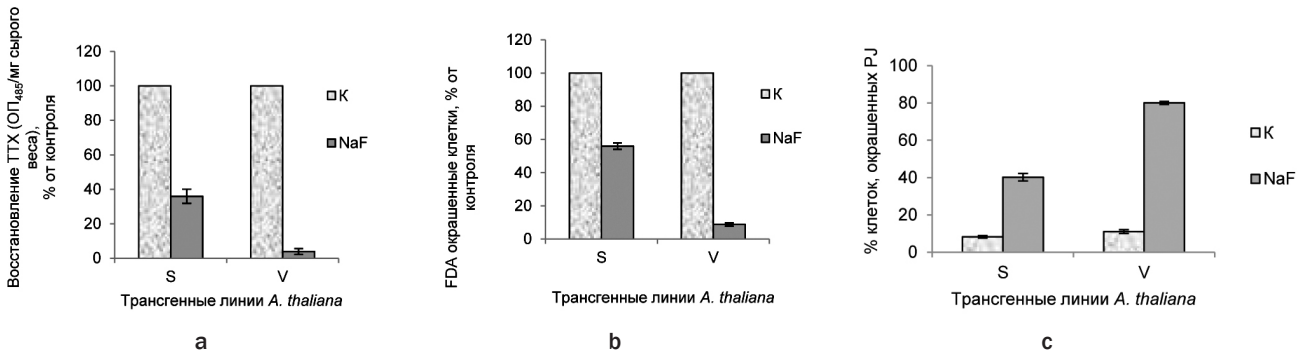


Рис. 4. Влияние конститутивного синтеза HSP101 на жизнеспособность клеток *A. thaliana* при обработке NaF. Клетки трансгенных линий инкубировали с 20 мМ NaF при температуре 26 °С в течение 24 ч. S – клетки линии с конститутивным синтезом HSP101; V – клетки линии, трансформированной пустым вектором. Жизнеспособность определяли с помощью восстановления ТТХ (a), окрашивания FDA (b) и PJ (c). Данные выражены в процентах от контроля по каждой линии отдельно

Fig. 4. Effect of HSP101 constitutive synthesis on *A. thaliana* cells viability. Transgenic cell lines were incubated with 20 mM NaF at 26 °C for 24 h. S – cells with constitutive HSP101 level, V – cells transformed with empty vector. Viability of cells was measured by reduction of TTC (a), FDA (b) and PJ staining (c). Data are expressed as percentage relative to the control samples separately for each line

инкубации при температуре 37°С как в трансгенных линиях, так и в культуре клеток дикого типа.

Подтвердив наличие конститутивного синтеза белка HSP101 в линии S, а также убедившись в том, что линия V по синтезу этого белка аналогична дикому типу и может быть использована в качестве контрольной, необходимо было выяснить, как конститутивная экспрессия гена *HSP101* повлияет на устойчивость *A. thaliana* к действию фторида натрия. Для этого линии, трансформированные *HSP101* (S) и пустым вектором (V), инкубировали с 20 мМ NaF в течение 24 ч и определяли мертвые и жизнеспособные клетки (рис. 4).

В зависимости от размеров клеточных агрегатов и для более полной достоверности результатов определение жизнеспособности проводили с использованием 3-х методов. Выживаемость агрегированной культуры *A. thaliana* устанавливали по способности живых клеток восстанавливать ТТХ (рис. 4, *a*). Жизнеспособность мелкоклеточных трансгенных культур клеток определяли по окрашиванию живых клеток флуоресцентным красителем флуоресцеин диацетатом (FDA) (рис. 4, *b*) и по окрашиванию мертвых клеток с помощью флуоресцентого красителя пропидий йодида (PI) (рис. 4, *c*). Как видно из рис. 4, *a*, при использовании метода восстановления ТТХ процент живых клеток у всех трансгенных линий снижался при действии NaF. Однако жизнеспособность у линии V снижалась гораздо сильнее (на 98%), чем у линии S (на 64%). Окрашивание клеток FDA дало сходные результаты. Жизнеспособность клеток линии S при обработке NaF снизилась на 45%, а линии V – на 93%. Окрашивание мертвых клеток с помощью PI показало, что в линии V процент мертвых клеток при обработке NaF увеличился с 11 до 80%. Тогда как в линии S относительное количество нежизнеспособных клеток составило 40%.

Таким образом, конститутивная экспрессия гена *HSP101* в клетках способствует повышению их жизнеспособности почти на 50% при действии фторида натрия. Результаты, свидетельствующие о том, что повышение количества HSP101 увеличивает жизнеспособность клеток *A. thaliana*, согласуются с данными, полученными при использовании культуры клеток табака, на которых конститутивная экспрессия гена *HSP101 A. thaliana* повышала устойчивость к фториду калия [26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данной работы показано, что обработка фторидом натрия в концентрации 20 мМ приводит к значительному снижению жизнеспособности у культуры клеток *A. thaliana*. В ответ на обработку 20 мМ NaF не было выявлено индукции экспрессии БТШ при нормальной температуре инкубирования, а также в условиях мягкого теплового стресса наблюдалось снижение экспрессии гена *HSP101*. Конститутивный синтез данного белка в клетках способствует повышению их жизнеспособности и устойчивости к действию фторида натрия. Подавление экспрессии БТШ фторидом натрия при мягком тепловом стрессе означает, что в естественной среде обитания в условиях потепления климата отрицательное воздействие антропогенного загрязнения фтором на растения будет увеличиваться, поскольку фтор подавляет защитные реакции растения.

Полученные данные свидетельствуют о важной роли HSP101 в устойчивости не только к тепловому стрессу, но и к химическим веществам. Искусственное повышение количества HSP101 методами генетики и селекции открывает широкие перспективы использования таких растений в санитарно-защитных зонах в районах с высоким загрязнением фторидами, а также в качестве фиторемедиантов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ипатова В.И., Габдуллина Р.И. Интерактивный эффект алюминия и фтора в присутствии микроводоросли // Экологические системы и приборы. 2022. N 7. С. 36-47. https://doi.org/10.25791/esip.7.2022.1309. EDN: WAEWMX.

2. Zouari M., Elloumi N., Bellassoued K., Ben Ahmed C., Krayem M., Delmail D., et al. Enzymatic antioxidant responses and mineral status in roots and leaves of olive plants subjected to fluoride stress // South African Journal of Botany. 2017. Vol. 111. P. 44–49. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.039.

3. Bhargava D., Bhardwaj N. Phytotoxicity of fluoride on a wheat variety *Triticum aestivum* var. Raj. 4083 and its bioaccumulation at the reproductive phase // Asian Journal of Experimental Sciences. 2011. Vol. 25, no. 1. P. 37–40. https://doi.org/10.3390/app10196971.

4. Jarosz Z., Pitura K. Fluoride toxicity limit – can the element exert a positive effect on plants? // Sustainability. 2021. Vol. 13, no. 21. P. 12065. https://doi.org/10.3390/su132112065.

5. Fornasiero R.B. Phytotoxic effects of fluorides // Plant Science. 2001. Vol. 161, no. 5. P. 979–985. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00499-X.

6. Kumar K., Giri A., Vivek P., Kalaiyarasan T., Kumar B. Effects of fluoride on respiration and photosynthesis in plants: an overview // Annals of Environmental Science and Toxicology. 2017. Vol. 2, no. 1. P. 43–47. https://doi.org/10.17352/aest.000011.

7. Cai H., Dong Y., Li Y., Li D., Peng C., Zhang Z., et al. Physiological and cellular responses to fluoride stress in tea (*Camellia sinensis*) leaves // Acta Physiologiae Plantarum. 2016. Vol. 38. P. 144. https://doi.org/10.1007/s11738-016-2156-0.

8. Sachan P., Lal N. Effect of sodium fluoride on germination, seedling growth and photosynthetic pigments in *Cicer arietinum* L. and *Hordeum vulgare* L. // Ecology & Environmental Sciences. 2018. Vol. 3, no. 4. P. 300–304. https://doi.org/10.15406/mojes.2018.03.00103.

9. Gao J., Liu C., Zhang J., Zhu S., Shen Y., Zhang R. Effect of fluoride on photosynthetic pigment content and antioxidant system of *Hydrilla verticillata* // International Journal of Phytoremediation. 2018. Vol. 20, no. 12. P. 1257–1263. https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1319328.

10. Mondal N.K. Effect of fluoride on photosynthesis, growth and accumulation of four widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in India // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2017. Vol. 144. P. 36–44. https://doi.org/10.7717/peerj.13434.

11. Singh S., Singh J., Singh N. Studies on the impact of fluoride toxicity on growth parameters of *Raphanus sativus* L. // Indian Journal of Scientific Research. 2013. Vol. 4, no. 1. P. 61–63.

12. Doley D., Hill R.J., Riese R.H. Environmental fluoride in Australasia: ecological effects, regulation and management // Clean Air and Environmental Quality. 2004. Vol. 38, no. 2. P. 35–55.

13. Rikhvanov E.G., Gamburg K.Z., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Fedoseeva I.V., Tauson E.L., et al. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture // Plant Journal. 2007. Vol. 52, no. 4. P. 763–778. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03275.x.

14. Qin F., Yu B., Li W. Heat shock protein 101 (HSP101) promotes flowering under nonstress conditions // Plant Physiology. 2021. Vol. 186, no. 1. P. 407–419. https://doi.org/10.1093/plphys/kiab052.

15. Queitsch C., Hong S.W., Vierling E., Lindquist S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis // Plant Cell. 2000. Vol. 12, no. 4. P. 479–492. https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.479.

16. Еникеев А.Г., Высоцкая Е.Ф., Леонова Л.А. Об использовании 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида для оценки жизнеспособности культур растительных клеток // Физиология растений. 1995. Т. 42. N 3. С. 423–426.

17. Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randell R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // Journal of Biological Chemistry. 1951. Vol. 193, no. 1. P. 265–275.

18. Pant P., Bhiravamurthy P. Effects of fluoride on early root and shoot growth of typical crop plants of India // Fluoride. 2008. Vol. 41, no. 1. P. 57–60.

19. Reddy M.P., Kaur M. Sodium fluoride induced growth and metabolic changes in *Salicornia brachiata* Roxb // Water, Air, and Soil Pollution. 2008. Vol. 188. P. 171–179. https://doi.org/10.1007/s11270-007-9533-7.

20. Матяшенко Г.В., Шмаков В.Н., Константинов Ю.М., Белоголова Г.А. Влияние экологических факторов на накопление фтора лиственницами (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. и *L. sibirica* Ledeb.) в Восточной Сибири // Экология. 2005. N 6. С. 434–437. EDN: HSIPKV.

21. Пуляевская М.А., Варакина Н.Н., Гамбург К.З., Русалёва Т.М., Степанов А.В., Войников В.К. [и др.]. Фторид натрия подавляет синтез БТШ в культуре клеток *Arabidopsis thaliana*, подвергнутых воздействию теплового стресса // Физиология растений. 2011. Т. 58. N 4. С. 533–541.

22. Ogawa D., Yamaguchi K., Nishiuchi T. High-level overexpression of the Arabidopsis HsfA2 gene confers not only increased themotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth // Journal of Experimental Botany. 2007. Vol 58, no. 12. P. 3373–3383. https://doi.org/10.1093/jxb/erm184.

23. Banti V., Mafessoni F., Loreti E., Alpi A., Perata P. The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in Arabidopsis // Plant Physiology. 2010. Vol. 152, no. 3. P. 1471–1483. https://doi.org/10.1104/pp.109.149815.

24. Saidi Y., Domini M., Choy F., Zryd J.P., Schwitzguebel J.P., Goloubinoff P. Activation of the heat shock response in plants by chlorophenols: transgenic Physcomitrella patens as a sensitive biosensor for organic pollutants // Plant, Cell and Environment. 2007. Vol. 30, no. 6. P. 753–763. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01664.x.

25. Kanzaki H., Saitoh H., Ito A., Fujisawa S., Kamoun S., Katou S., et al. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana* // Molecular Plant Pathology. 2003. Vol. 4, no. 5. P. 383–391. https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00186.x.

26. Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Семёнова Л.А., Шафикова Т.Н., Гаманец Л.В., Волкова О.Д. [и др.]. Культуры клеток табака, трансформированные геном hsp101, обладают повышенной устойчивостью к фториду калия // Доклады Академии наук. 2010. Т. 430. N 1. С. 137–138.

REFERENCES

1. Ipatova V.I., Gabdullina R.I. Interactive effect of aluminum and fluorine in the presence of microalgae. *Ekologicheskie sistemy i pribory.* 2022;(7):36-47. (In Russian).
https://doi.org/10.25791/esip.7.2022.1309. EDN: WAEWMX.

2. Zouari M., Elloumi N., Bellassoued K., Ben Ahmed C., Krayem M., Delmail D., et al. Enzymatic antioxidant responses and mineral status in roots and leaves of olive plants subjected to fluoride stress. *South African Journal of Botany.* 2017;111:44-49.
https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.039.

3. Bhargava D., Bhardwaj N. Phytotoxicity of fluoride on a wheat variety *Triticum aestivum* var. Raj. 4083 and its bioaccumulation at the reproductive phase. *Asian Journal of Experimental Sciences.* 2011;25(1):37-40.
https://doi.org/10.3390/app10196971.

4. Jarosz Z., Pitura K. Fluoride toxicity limit – can the element exert a positive effect on plants? *Sustainability.* 2021;13(21):12065.
https://doi.org/10.3390/su132112065.

5. Fornasiero R.B. Phytotoxic effects of fluorides. *Plant Science.* 2001;161(5):979-985.
https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00499-X.

6. Kumar K., Giri A., Vivek P., Kalaiyarasan T., Kumar B. Effects of fluoride on respiration and photosynthesis in plants: an overview. *Annals of Environmental Science and Toxicology.* 2017;2(1):43-47. https://doi.org/10.17352/aest.000011.

7. Cai H., Dong Y., Li Y., Li D., Peng C., Zhang Z., et al. Physiological and cellular responses to fluoride stress in tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Acta Physiologiae Plantarum.* 2016;38:144.
https://doi.org/10.1007/s11738-016-2156-0.

8. Sachan P., Lal N. Effect of sodium fluoride on germination, seedling growth and photosynthetic pigments in *Cicer arietinum* L. and *Hordeum vulgare* L. *Ecology & Environmental Sciences.* 2018;3(4):300-304.
https://doi.org/10.15406/mojes.2018.03.00103.

9. Gao J., Liu C., Zhang J., Zhu S., Shen Y., Zhang R. Effect of fluoride on photosynthetic pigment content and antioxidant system of *Hydrilla verticillata*. *International Journal of Phytoremediation.* 2018;20(12):1257-1263.
https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1319328.

10. Mondal N.K. Effect of fluoride on photosynthesis, growth and accumulation of four widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in India. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2017;144:36-44.
https://doi.org/10.7717/peerj.13434.

11. Singh S., Singh J., Singh N. Studies on the impact of fluoride toxicity on growth parameters of *Raphanus sativus* L. *Indian Journal of Scientific Research.* 2013;4(1):61-63.

12. Doley D., Hill R.J., Riese R.H. Environmental fluoride in Australasia: ecological effects, regulation and management. *Clean Air and Environmental Quality.* 2004;38(2):35-55.

13. Rikhvanov E.G., Gamburg K.Z., Varakina N.N., Rusaleva T.M., Fedoseeva I.V., Tauson E.L., et al. Nuclear-mitochondrial cross-talk during heat shock in Arabidopsis cell culture. *Plant Journal.* 2007;52(4):763-778.
https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03275.x.

14. Qin F., Yu B., Li W. Heat shock protein 101 (HSP101) promotes flowering under nonstress conditions. *Plant Physiology.* 2021;186(1):407-419.
https://doi.org/10.1093/plphys/kiab052.

15. Queitsch C., Hong S.W., Vierling E., Lindquist S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2000;12(4):479-492.
https://doi.org/10.1105/tpc.12.4.479.

16. Enikeev A.G., Vysotskaya E.F., Leonova L.A. On the use of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride to assess the integrity of plant cells. *Fiziologiya rastenii = Russian Journal of Plant Physiology.* 1995;42(3):423-426. (In Russian).

17. Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randell R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.* 1951;193(1):265-275.

18. Pant P., Bhiravamurthy P. Effects of fluoride on early root and shoot growth of typical crop plants of India. *Fluoride.* 2008;41(1):57-60.

19. Reddy M.P., Kaur M. Sodium fluoride induced growth and metabolic changes in *Salicornia brachiata* Roxb. *Water, Air, and Soil Pollution.* 2008;188:171-179.
https://doi.org/10.1007/s11270-007-9533-7.

20. Matyashenko G.V., Belogolova G.A., Shmakov V.N., Konstantinov Y.M. Effect of ecological factors on the accumulation of fluorine by larches, *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. and *L. sibirica* Ledeb., in Eastern Siberia. *Ekologiya.* 2005;(6):434-437. (In Russian). EDN: HSIPKV.

21. Pulyaevskaya M.A., Varakina N.N., Gamburg K.Z., Rusaleva T.M., Stepanov A.V., Voinikov V.K., et al. Sodium fluoride suppresses HSP synthesis in *Arabidopsis thaliana* cell culture subjected to heat stress. *Fiziologiya rastenii = Russian Journal of Plant Physiology.* 2011;58(4):533-541. (In Russian).

22. Ogawa D., Yamaguchi K., Nishiuchi T. High-level overexpression of the Arabidopsis HsfA2 gene confers not only increased themotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *Journal of Experimental Botany.* 2007;58(12):3373-3383.
https://doi.org/10.1093/jxb/erm184.

23. Banti V., Mafessoni F., Loreti E., Alpi A., Perata P. The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology.* 2010;152(3):1471-1483.
https://doi.org/10.1104/pp.109.149815.

24. Saidi Y., Domini M., Choy F., Zryd J.P., Schwitzguebel J.P., Goloubinoff P. Activation of the heat shock response in plants by chlorophenols: transgenic Physcomitrella patens as a sensitive biosensor for organic pollutants. *Plant, Cell and Environment.* 2007;30(6):753-763.
https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01664.x.

25. Kanzaki H., Saitoh H., Ito A., Fujisawa S., Kamoun S., Katou S., et al. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology.* 2003;4(5):383-391.
https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00186.x.

26. Enikeev A.G., Kopytina T.V., Semenova L.A., Shafikova T.N., Gamanets L.V., Volkova O.D., et al. Tobacco cell cultures transformed with the hsp101 gene have increased resistance to potassium fluoride. *Doklady Akademii nauk.* 2010;430(1):137-138. (In Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Горбылева Елена Леонидовна,
к.б.н., младший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉dzubina@sifibr.irk.ru
https://orcid.org/ 0000-0002-6858-380X

Сафонова Мария Александровна,
к.б.н., преподаватель,
Байкальский гуманитарный институт,
664011, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 37,
Российская Федерация,
marjera@mail.ru
https://orcid.org/ 0000-0001-9495-6246

Степанов Алексей Владимирович,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
stepanov@sifibr.irk.ru
https://orcid.org/ 0000-0002-0456-3690

Рихванов Евгений Геннадьевич,
д.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
eugene @sifibr.irk.ru
https://orcid.org/ 0000-0001-7758-4540

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 30.01.2023.
Одобрена после рецензирования 24.05.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena L. Gorbyleva,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS,
132, Lermontov St., 664033, Irkutsk,
Russian Federation,
✉dzubina@sifibr.irk.ru
https://orcid.org/ 0000-0002-6858-380X

Mariya A. Safonova,
Cand. Sci. (Biology), lecturer,
Baikal Humanitarian Institute
37, K. Marx St., 664011, Irkutsk,
Russian Federation,
marjera@mail.ru
https://orcid.org/ 0000-0001-9495-6246

Alexey V. Stepanov,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS,
132, Lermontov St., 664033, Irkutsk,
Russian Federation,
stepanov@sifibr.irk.ru
https://orcid.org/ 0000-0002-0456-3690

Evgenii G. Rikhvanov,
Dr. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS,
132, Lermontov St., 664033, Irkutsk,
Russian Federation,
eugene @sifibr.irk.ru
https://orcid.org/ 0000-0001-7758-4540

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 30.01.2023.
Approved after reviewing 24.05.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 581.412:633.877
EDN: NSIUEC
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-442-453

Изучение активности антиоксидантных ферментов у сомаклональных вариантов картофеля для использования в селекционном отборе на устойчивость к вирусу PVS

И.В. Киргизова*✉, Е.А. Калашникова*, А.М. Гаджимурадова, Д.В. Силаев***, Р.М. Турпанова****, С.Б. Жангазин****

**Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва, Российская Федерация*
***Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, г. Астана, Республика Казахстан*
****Национальный центр биотехнологии, г. Астана, Республика Казахстан*
*****Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г. Астана, Республика Казахстан*

Аннотация. *В статье представлены результаты по исследованию активности антиоксидантной системы картофеля в ответ на инфицирование PVS-вирусом. Вирус PVS широко распространен на территории Омской области. Цель исследования – изучение активности антиоксидантных ферментов у сомаклональных вариантов картофеля при инфицировании вирусом PVS для получения ценных сортовых признаков с целью использования в селекционном отборе. В качестве объектов исследования были отобраны сорта картофеля Ермак, Алена и Хозяюшка селекции ФГБНУ «Омский аграрный научный центр». Изучали различия в устойчивости к вирусной инфекции у разных по восприимчивости сортов и полученных сомаклонов на примере изменения активности изоферментного состава антиоксидантных ферментов. Результаты показали, что у сомаклона ЕС1, полученного от восприимчивого сорта Ермак, при инфицировании было обнаружено два дополнительных изофермента и отмечено повышение активности изопероксидаз по сравнению с контролем. У образцов, полученных от устойчивого ХС94 и умеренно восприимчивого сорта АС91, количество изопероксидаз не увеличивалось, но отмечалось повышение их активности. У инфицированных растений происходит активация дополнительных 3-х изоформ каталазы, относительно контроля – 1 изоформа, причем у сомаклонального образца ЕС1 была обнаружена 4-я изоформа каталазы. При изучении спектров супероксиддисмутазы у контрольной группы проявлялась активность Mn-СОД и Fe-СОД, в то время как у сомаклональных образцов ХС94, АС91 и ЕС1 были выявлены две формы фермента: Fe- и Cu/Zn-СОД, которые играют значительную роль при нейтрализации супероксид-радикала.*

Ключевые слова: *Solanum tuberosum L., антиоксидантные ферменты, вирус картофеля PVS, каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза*

Для цитирования: Киргизова И.В., Калашникова Е.А., Гаджимурадова А.М., Силаев Д.В., Турпанова Р.М., Жангазин С.Б. Изучение активности антиоксидантных ферментов у сомаклональных вариантов картофеля для использования в селекционном отборе на устойчивость к вирусу PVS // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 442–453. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-442-453. EDN: NSIUEC.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Study of the activity of antioxidant enzymes in somaclonal potato variants for use in selection for resistance to the PVS virus

Irina V. Kirgizova*✉, Elena A. Kalashnikova*, Aisarat M. Gadzhimyradova, Dmitry V. Silaev***, Rauza M. Turpanova****, Sayan B. Zhangazin****

**Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russian Federation*
***S. Seifullin Kazakh Agro Technical Research University, Astana, Republic of Kazakhstan*
****National Center for Biotechnology, Astana, Republic of Kazakhstan*
*****L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Republic of Kazakhstan*

© Киргизова И.В., Калашникова Е.А., Гаджимурадова А.М., Силаев Д.В., Турпанова Р.М., Жангазин С.Б., 2023

Abstract. *The article presents the results of a study into the activity of the antioxidant system of potatoes in response to infection with the PVS virus. The PVS virus is widespread in the Omsk region. The work set out to study the activity of antioxidant enzymes in somaclonal potato variants when infected with PVS virus to obtain valuable varietal characteristics for use in breeding selection. Potato varieties Yermak, Alena and the Khozyayushka were selected from the Omsk Agrarian Scientific Centre breeding lines as objects of research. Differences in resistance to viral infection in varieties of different susceptibility and obtained somaclones were studied using the example of changes in the activity of the isoenzyme composition of antioxidant enzymes. The results showed that somaclone EC1, which was derived from the susceptible Yermak variety, had two additional isoenzymes upon infection and an increase in isoperoxidase activity compared to the control. Although the number of isoperoxidases did not increase in the samples obtained from the stable HC94 and the moderately susceptible AC91 variety, an increase in their activity was noted. Activation occurs in infected plants of the additional 3rd isoforms of catalase compared to the control – 1 isoform, while the 4th isoform of catalase was detected in the EC1 somaclonal sample. When studying the superoxide dismutase spectra, the control group showed the activity of Mp-SOD and Fe-SOD, while two forms of the enzyme were identified in the HC94, AC91 and EC1 somaclonal samples: Fe- and Cu/Zn-SOD. These forms play a significant role in the neutralisation of the superoxide radical.*

Keywords: *Solanum tuberosum L., antioxidant enzymes, Potato Virus S, catalase, peroxidase, superoxide dismutase*

For citation: Kirgizova I.V., Kalashnikova E.A., Gadzhimyradova A.M., Silaev D.V., Turpanova R.M., Zhangazin S.B. Study of the activity of antioxidant enzymes in somaclonal potato variants for use in selection for resistance to the PVS virus. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(3):442–453. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-442-453. EDN: NSIUEC.

ВВЕДЕНИЕ

В ответ на негативное влияние факторов окружающей среды, в том числе и инфицирование вирусами, растения выработали механизм защиты, который основан на повышении уровня активных форм кислорода (АФК) [1]. Молекулы АФК образуются постоянно и являются необходимыми для инактивации патогенов, синтеза лигнина, запуска процессов старения, передачи сигналов, метаболизма фитогормонов и других реакций в клетках растений. В клетках и тканях постоянно поддерживается баланс образования и разрушения молекул активных форм кислорода. При выращивании растений в нормальных условиях окружающей среды молекулы активных форм кислорода не способны причинить какой-либо вред растениям, т.к. они постоянно инактивируются с помощью ряда антиокислительных механизмов [2, 3]. Однако при воздействии стрессоров уровень АФК может значительно повышаться, что ведет к образованию и накоплению радикалов $\bullet O_2^-$, •OH, NO, которые могут приводить к повреждениям клеточных структур растений, таких как белки, липиды, нуклеиновые кислоты. В большинстве случаев наиболее потенциально опасным эффектом от накопления АФК является то, что при высоких концентрациях они вызывают апоптоз [4]. Для того чтобы предотвратить повреждение клеточных компонентов от молекул АФК, растения выработали сложную антиоксидантную систему защиты, которая позволяет растениям адаптироваться к различным стрессовым факторам окружающей среды [5–7]. Основные компоненты антиоксидантной системы растительных клеток и тканей представлены неферментативной частью: каротиноиды, аскорбаты, глутатионы и токоферолы, аскорбиновая кислота и другие, а также ферментативной частью: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, пероксидаза, аскорбатпероксидаза [8, 9].

Изучению активности антиоксидантных ферментов у растений в ответ на воздействия абиотических и биотических факторов среды посвящено много научно-исследовательских работ. Так, например, существуют данные, демонстрирующие различия в активности ферментов антиоксидантной системы у разных по восприимчивости сортов картофеля при воздействии на растения биотических и абиотических стрессоров [10–12].

Вирусы картофеля являются одним из наиболее широко распространенных стрессоров, которые оказывают негативное влияние на качество и урожай картофеля, приводя к значительным экономическим потерям. В настоящее время установлено, что количество регионов, в которых зафиксировано распространение вирусных болезней картофеля, постоянно увеличивается. Это происходит за счет расширения круга растений из различных семейств, поражаемых вирусными инфекциями, и появления новых, ранее неизвестных вирусов или их более опасных штаммов. Применяемые химические средства защиты растений от вирусных болезней малоэффективны в силу проникновения и размножения вирусов в мезофилле и дальнейшего распространения по растению. Кроме того, в случае вспышек вирусных инфекций применяют инсектициды, чтобы свести к минимуму количество насекомых, служащих переносчиками вирусных инфекций. Для того чтобы уменьшить химическую нагрузку на растения и почву, необходимо изучать естественные механизмы защиты растений и создавать комплексно устойчивые сорта.

Для картофеля одним из опасных и повсеместно распространенных вирусов является мозаичный вирус PVS, симптомы от инфицирования которым практически не проявляются на растении, но приводят к ухудшению качества и снижению урожая, особенно при заражении растения совместно еще и другими мозаичными вирусами [13].

Исходя из вышеизложенного, целью работы являлось изучение активности антиоксидантных ферментов у сомаклональных вариантов картофеля при инфицировании вирусом PVS для получения новых ценных сортовых признаков при использовании в селекционном отборе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования служили сорта картофеля отечественной селекции Алена, Ермак, Хозяюшка, полученные специалистами Сибирского научно-исследовательского института сельского хозяйства (ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»). Сорта отличались по воспри-

имчивости к вирусным инфекциям: Хозяюшка – умеренно устойчивый сорт; Алена – умеренно восприимчивый сорт; Ермак – восприимчивый сорт. Данные сорта были использованы в качестве объектов для проведения работ по индукции каллусной ткани.

Получение каллусной культуры, пассирование и индукция стеблевого органогенеза. Клубни стерилизовали 96%-м этиловым спиртом 15 сек с последующим 3-кратным промыванием дистиллированной водой и помещали в термостат (22±2 °С) (ТС-1/80 СПУ, Россия) на 30–45 суток для инициации образования побегов длиной 1–2 см. Полученные побеги нарезали на сегменты размером 4–6 мм и изолировали листовые пластинки для получения каллусной культуры. Растительный материал стерилизовали в 4%-м растворе гипохлорита натрия (Омега, Россия) 10 мин, затем 70%-м спиртом 1 мин с последующей промывкой стерильной дистиллированной водой [14]. Каллусную ткань получали на питательной среде Мурасиге–Скуга (МС) с добавлением 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1–5 мг/л, 6-фурфуриламинопурина (кинетина) (Sigma-Aldrich, США) 0,05–0,25 мг/л, сахарозы 30 г/л, агара 7 г/л. Экспланты были разделены на две группы: первую группу культивировали в чашках Петри в течение 2 недель в условиях темноты в термостате (26±2 °С), вторую группу культивировали в условиях освещенности 5000 лк при той же температуре. В качестве контроля использовали питательную среду без гормонов. Пассирование проводили каждые 30–35 суток. Сомаклональные образцы получали из каллусной ткани на 1, 7 и 19-м пассаже из активно растущего каллуса, идентичного по фенотипическим показателям.

Регенерация растений in vitro и выращивание микроклонов в почвенных условиях. Регенерацию растений из каллусной ткани проводили на среде МС с индолил-3-уксусной кислотой (ИУК) (Sigma-Aldrich, США) (0,1 мг/л), фолиевой кислотой (0,5 мг/л), глюкозой (10000 мг/л), сахарозой (30 г/л) и агаром (7 г/л). Культивирование осуществляли в световой комнате при температуре 22±2 °С и освещении белыми люминесцентными лампами (Ledvance, Германия) с интенсивностью 5000 лк.

Полученные растения-регенеранты после 4-х месяцев культивирования пересаживали в горшочки со смесью торфа и песка в соотношении 3:1 с последующей пересадкой в теплицу на расстоянии 15–20 см друг от друга в ряду, на 4 сутки производили полив раствором Кнопа. Предварительно почву обрабатывали 0,1%-м перманганатом калия и препаратом «Фундазол» (ЗАО «Август», Россия) для исключения грибной инфекции. Клубни первой репродукции растений картофеля, полученные через длительно культивируемую каллусную ткань, отбирали по отличиям в цвете мякоти и окраске кожуры клубней от контрольных сортов картофеля. Далее отобранные образцы использовали для получения клубней второй репродукции. Отбор образцов проводился во время цветения растений картофеля вследствие того, что именно в этот период наиболее четко проявляются внешние сортоотличительные признаки не только по окраске, но и по форме кустов и листьев, наличию пигментов на стебле и др.

Моделирование биотического стресса (вирус PVS^0, DSMZ PV–0838). Для заражения использовали растения-регенеранты в возрасте 4-х недель в строгом соответствии с фенотипическими признаками сорта: вегетативная масса, высота растений, форма и размер листовых пластинок, форма и окраска клубня. У растений инокулировали две листовые пластинки при микроповреждении карборандумом со свежеприготовленной смесью вирусных частиц (5 нг/мл) и 10 мМ фосфатного буфера, pH=7,0 в объеме по 100 мкл на одну листовую пластину. Растения контрольной группы и искусственно зараженные растения картофеля выращивали в теплице в контролируемых условиях.

Диагностика растений картофеля на наличие мозаичных вирусов методами ИФА и ИХА. Диагностику растений осуществляли методом DAS–ELISA на иммуноферментном анализаторе Labsystems Multiskan Plus, фильтр 405 нм (Thermo Scientific, США) с использованием тест-систем на вирусы PVY, PVX, PVM, PVS, PLRV (Bioreba AG, Швейцария).

Электрофорез белков. Суммарный электрофорез белков растений проводили методом нативного электрофореза в полиакриламидном геле (7,5%) [15]. Листья исследуемых образцов картофеля гомогенизированы в фарфоровых ступках на льду с добавлением предварительно охлажденного экстракционного буфера. Соотношение растительного материала и буфера для экстракции – 1:2. Экстракционный буфер состоял из 250 мМ TRIS-HCl (pH=7,5), 250 мМ сахарозы, 0,05 мМ молибдата натрия, 1 мМ (EDTA), 4 мМ 1,4-дитиотреитола (DTT), 5 мМ L-цистеина, 0,001 мМ апротинина, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF) и 0,001 мМ пепстатина.

После гомогенизации все образцы центрифугировали (15000 об/мин, 4 °С, 15 мин). Супернатант переносили в новые пробирки во избежание загрязнения геля в области загрузочных лунок. Электрофорез проводили от источника тока при 110 В и 50 мА в течение 2-х ч.

Определение активности изоферментов каталазы проводили с применением 2-компонентного субстрата с модификациями метода [16]. Гель трижды промывали в дистиллированной воде (15 мин), инкубировали в 100 мл 0,03% H_2O_2 (10 мин) при покачивании на шейкере (80 об/мин). Окрашивание гелей основывалось на восстановлении гексацианоферрата (III) калия ($K_3(Fe(CN)_6)$) H_2O_2 до гексацианоферрата (II) калия ($K_4(Fe(CN)_6)$) и реакции гексацианоферрата (II) калия с хлоридом железа (III) ($FeCl_3$) с образованием берлинской лазури. Гели окрашивали в смеси первого и второго субстратов до проявления бесцветных полос на окрашенном в темно-зеленый или сине-зеленый цвет фоне, т.к. каталаза разлагает H_2O_2, то окрашивание не происходило в местах ее расположения. После гели сканировали, инвертировали и анализировали с помощью программного обеспечения Image J.

Определение изоферментов пероксидазы проводили с помощью субстрата, содержащего 50 мл 50 мМ ацетатного буфера (pH=5,5), 100 мкл 3% H_2O_2, 20 мг 3,3´,5,5´-триметилбензидина. Электрофорез проводили в модифицированной системе по Андерсон, Борг и Микаэльсон [17]. Гель инкубировали в ацетатном буфере в течение 10 мин, затем буфер сливали и вносили раствор бензидина (0,005 М, 20 мин). Далее гель промывали дистиллированной водой и помещали в 0,015% H_2O_2 до появления характерных полос бирюзового цвета на прозрачном фоне геля (1–2 мин). Для фиксации зон пероксидазной активности гель промывали 10%-й уксусной кислотой.

Определение изоферментов различных форм супероксиддисмутазы проводили согласно протоколу Бошам Ч.Х. и Фридович И. с небольшими модификациями [18]. Гель промывали трижды в дистиллированной воде (5 мин), далее инкубировали в 0,1%-м растворе нитросинего тетразолия NBT (15 мин) с внесением 4%-го этанола при покачивании на шейкере (80 об/мин) в условиях полной темноты. После гель промывали и инкубировали в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH=7,8) с 28 мМ рибофлавина, 28 мМ TEMED, 0,25 мМ NBT. Затем гель промывали в буферном растворе и иллюминировали в гельдокументирующей системе (Fusion-FX6-XT-820. WL/M) под УФ-облучением (30–45 мин, температура 20–25 °С) до появления бесцветных полос супероксиддисмутазы на темно-фиолетовом фоне геля. Идентификацию форм СОД проводили путем обработки гелей в растворах ингибиторов, 3 мМ KCN или 5 мМ H_2O_2 за 30 мин до окрашивания. Форма Mn-СОД устойчива к обоим ингибиторам, Fe-СОД устойчива к KCN, но чувствительна к H_2O_2, тогда как форма Cu/Zn-СОД чувствительна к обоим ингибиторам.

Молекулярные массы ферментов получены в результате обработки электрофореграммы с помощью программы BioCapt (при разрешении 800 dpi) (Vilber Lourmat). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ MS Excel 2018, GraphPad Prism (v. 6.01) (GraphPad Prism User Guide, 2019). Для выявления различий между парами выборок использовался 2-валентный непарный t-критерий Стьюдента (неравная дисперсия 2-х выборок). Эксперименты проводили в 4-кратной биологической повторности и 2–3-х аналитических повторностях. Данные с 4-х независимых повторов были преобразованы в числовые значения (±SD) при помощи графического редактора Image J, статистический анализ (One-Way Annova test) проведен посредством программного обеспечения GraphPad Prism (v. 6.01). Данные представлены в относительных единицах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ современных научных источников показал, что наиболее эффективным методом селекции при получении новых линий картофеля может выступать спонтанный мутагенез, который может быть вызван активацией транспозонов, приводящих к изменению экспрессии собственных генов растения, и появлением точечных мутаций. Применение клеточных культур *in vitro* позволяет получать новые линии растений, характеризующихся новыми хозяйственно-ценными признаками, и может быть использовано для создания комплексно-устойчивых растений картофеля. Выступающие в качестве объектов сомаклональной изменчивости каллусные ткани картофеля в условиях *in vitro* лишены тонкой сбалансированной регуляции, присущей целостному растению картофеля, в связи с этим на стабильность и изменчивость каллусной культуры оказывает влияние длительность пребывания каллусной ткани в стадии неорганизованного роста, выбор первичного экспланта и гормонального состава питательной среды[1].

В работе сомаклональные варианты картофеля были получены из каллусной культуры. Установлено, что листовые экспланты обладают большей способностью образовывать каллусы по сравнению со стеблевыми эксплантами у всех изучаемых сортов картофеля. Поэтому в дальнейшей работе использовали каллус, полученный только из листовых эксплантов на разных пассажах. Экспериментально установлено, что наиболее интенсивный каллусогенез на листовых эксплантах наблюдали на 7–9 сутки на среде МС с внесением 5 мг/л (2,4-Д) и 0,25 мг/л кинетина. Следует отметить, что образование каллусов происходило более активно в условиях полной темноты, а при выращивании каллусов при освещении наблюдали образование белого налета на поверхности и мелких глобулярных структур по периферии каллусной ткани (рис. 1), что согласуется с данными Халафалла М.М., Элалим К.Г. и других [19].

Рис. 1. Каллусная ткань с образованием глобулярных структур

Fig. 1. Callus Tissue with the formation of globular structures

Отмечено, что на питательной среде МС с внесением 2,4-Д и кинетина происходило формирование каллусной ткани средней плотности светло-желтого цвета с меристематическими участками, из которых в дальнейшем получали растения-регенеранты (рис. 2).

В дальнейшем из морфогенных каллусных культур было получено 150 растений-регенерантов, которые были проанализированы методом ИФА на отсутствие мозаичных вирусов картофеля (рис. 3).

Установлено, что 98,7% растений имели нормальную морфологию и высокую жизнеспособность, для остальных растений (1,3%) отмечено формирование укороченных междоузлий. Стабильным признаком оказалась окраска цветков, что согласуется с результатами других авторов, которые показали, что именно цветок характеризуется очень слабой изменчивостью, т.к. он относится к наиболее консервативным органам у картофеля[2].

В результате дальнейшего культивирования растений в течение 3–4 пассажей происходило появление большего количества аномальных растений: формировались укороченные междоузлия, изменялась форма

[1]Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений: учебник и практикум для вузов. М.: Юрайт, 2020. С. 270–272.
[2]Леонова Н.С. Изменчивость в культуре картофеля (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* и возможности ее использования в селекции и семеноводстве: дис. … д-ра биол. наук. Улан-Удэ: ВСГТУ, 2010. 209 с.

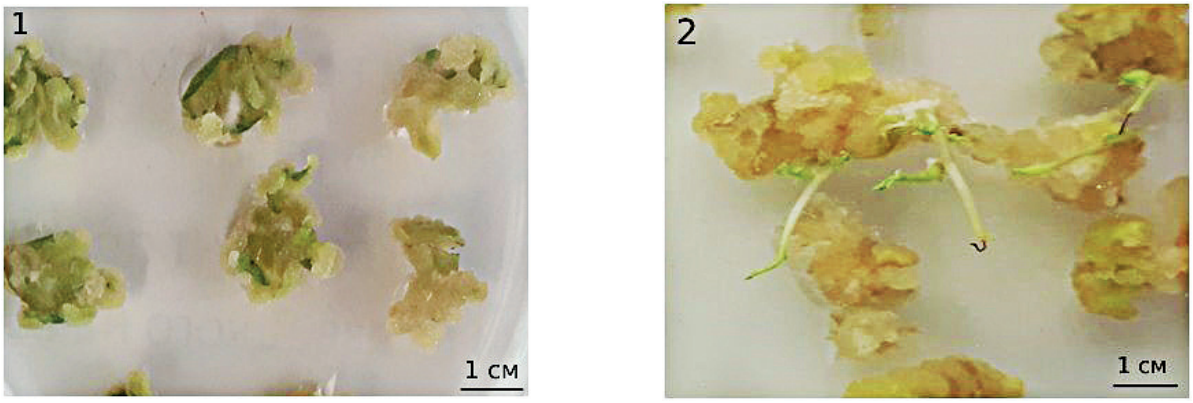


Рис. 2. Индукция каллусообразования у стеблевых эксплантов картофеля: 1 – морфогенная каллусная ткань с участками плотной паренхимной и меристематической ткани; 2 – каллусная ткань средней плотности светло-желтого цвета с меристематическими зонами

Fig. 2. Induction of callus formation in potato stem explants: 1 – morphogenic callus tissue with areas of dense parenchymal and meristematic tissue; 2 – medium-density callus tissue of light yellow color with meristematic zones

Рис. 3. Растения-регенеранты картофеля, полученные из меристематической каллусной ткани

Fig. 3. Potato regenerated plants obtained from meristematic callus tissue

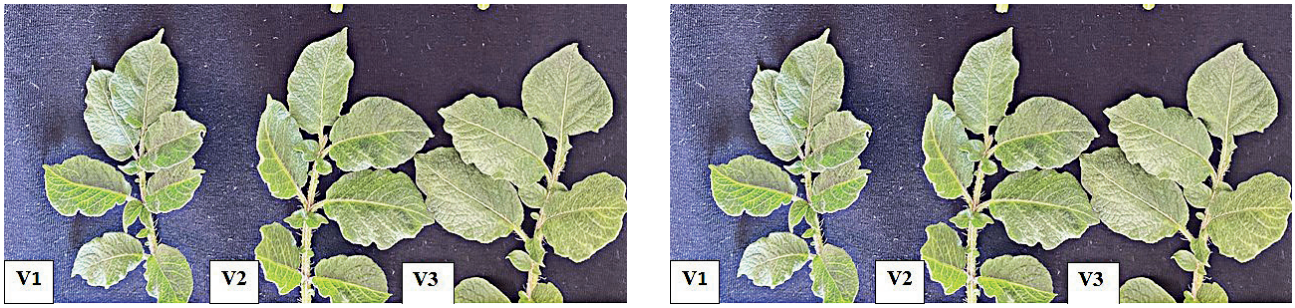


Рис. 4. Инфицированные растения картофеля с отсутствием проявления признаков развития инфекции: V1 – сорт Ермак, V2 – сорт Алена, V3 – сорт Хозяюшка; EC1, AC91, XC94 – сомаклональные образцы картофеля

Fig. 4. Infected potato plants with no signs of infection development: V1 – Ermak variety, V2 – Alena variety, V3 – Khozyayushka variety; EC1, AC91, XC94 – somaclonal potato samples

листовой пластинки, кроме того, наблюдалась гибель при пересадке в почвенные условия. В результате исследования после 4-х месяцев культивирования было получено 1915 растений-регенерантов, которые были перенесены в почвенные условия, и к концу вегетации получено 8618 клубней первой репродукции. Все полученные клубни были оценены по цвету мякоти и окраске кожуры. По результатам морфологического анализа были отобраны образцы, различающиеся между собой и от контрольного варианта по этим признакам. Так, например, в контроле цвет мякоти клубня у сорта Алена был белый, в то время как в сомаклональных образцах – бледно-желтый и желтый, у образцов, полученных через каллусную ткань от сорта Ермак, цвет мякоти был белый, но отсутствовали красные включения. Наибольший интерес представляли сомаклональные образцы картофеля, полученные от сорта Ермак – EC1, от сорта Алена – AC91 и от сорта Хозяюшка – XC94,

которые отличались от исходных линий растений по содержанию белка и крахмала [20].

Растения картофеля второй репродукции сортов Ермак, Алена, Хозяюшка и сомаклональные варианты ЕС1, АС91 и ХС94, инфицированные вирусом PVS^0, не проявляли внешние признаки развития вирусной инфекции (рис. 4).

Результаты успешного инфицирования растений картофеля вирусом были подтверждены методом ИФА (таблица).

Тестирование сортообразцов картофеля на наличие вирусной инфекции с использованием набора тестеров к вирусам методом ИФА

Testing potato varieties for the presence of a viral infection using a set of testers for viruses by ELISA

Наименование образца	Оптическая плотность пробы	Положительный контроль	Отрицательный контроль	Вирус (+/–)
PVX				
Ермак	0,053	0,788	0,058	–
Алена	0,054	0,788	0,058	–
Хозяюшка	0,052	0,788	0,058	–
ЕС-1	0,067	0,788	0,058	–
ХС-94	0,024	0,788	0,058	–
АС-91	0,073	0,788	0,058	–
PVY				
Ермак	0,095	0,987	0,054	–
Алена	0,057	0,987	0,054	–
Хозяюшка	0,083	0,987	0,054	–
ЕС-1	0,033	0,987	0,054	–
ХС-94	0,048	0,987	0,054	–
АС-91	0,055	0,987	0,054	–
PVS				
Ермак	0,821	0,993	0,051	+
Алена	0,793	0,993	0,051	+
Хозяюшка	0,837	0,993	0,051	+
ЕС-1	0,994	0,993	0,051	+
ХС-94	0,892	0,993	0,051	+
АС-91	0,796	0,993	0,051	+
PVM				
Ермак	0,110	0,789	0,044	–
Алена	0,071	0,789	0,044	–
Хозяюшка	0,196	0,789	0,044	–
ЕС-1	0,102	0,789	0,044	–
ХС-94	0,097	0,789	0,044	–
АС-91	0,065	0,789	0,044	–
PLRV				
Ермак	0,053	0,827	0,038	–
Алена	0,066	0,827	0,038	–
Хозяюшка	0,051	0,827	0,038	–
ЕС-1	0,055	0,827	0,038	–
ХС-94	0,064	0,827	0,038	–
АС-91	0,043	0,827	0,038	–

При изучении спектров пероксидаз у картофеля были получены следующие результаты: у контрольной группы растений выявлена активность 4-х изоформ у сорта картофеля Ермак, 5 изоформ – у сорта Алена и 6 изоформ – у сорта Хозяюшка, в то время как у инфицированных вирусом сомаклональных образцов картофеля обнаружено 5 изоформ у образца АС91, полученного от сорта Алена, и 6 изоформ у образцов ЕС1 и ХС94, полученных от сортов Ермак и Хозяюшка (рис. 5).

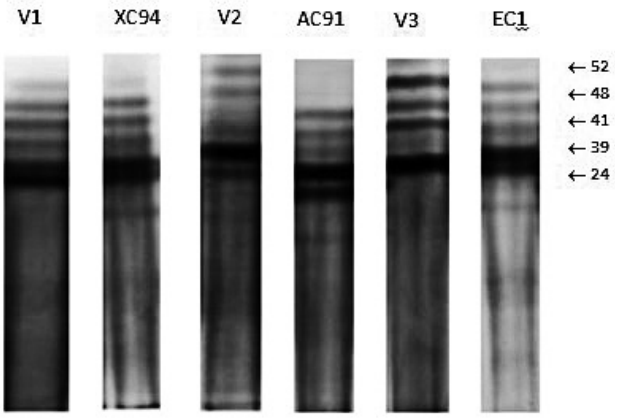


Рис. 5. Определение *in gel* активности изопероксидаз в листьях картофеля, где V1 – Хозяюшка, V2 – Алена, V3 – Ермак – образцы, экстрагированные из контрольной группы; ХС94, АС91, ЕС1 – образцы, экстрагированные из сомаклональных образцов картофеля. Молекулярные массы получены в результате обработки электрофореграммы с помощью программы BioCapt (Vilber Lourmat)

Fig. 5. Determination of *in gel* activity of isoperoxidases in potato leaves, where V1 is Hostess, V2 is Alena, V3 is Ermak are samples extracted from the control group; XC94, AC91, EC1 are samples extracted from somaclonal potato samples. Molecular masses were obtained by processing the electrophoregram using the BioCapt program (Vilber Lourmat)

У микроклона ЕС1, полученного от восприимчивого сорта Ермак, инфицированного вирусом, было обнаружено два дополнительных изозима по сравнению с контролем – V3, следует отметить, что активность изопероксидаз у данного сомаклона увеличивалась при заражении вирусом, которая проявлялась в интенсификации окрашивания полос по сравнению с контрольным образцом.

Для умеренно устойчивого сорта Алена (V2) и его сомаклонального образца АС91 количество изозимов не изменялось. Следует отметить, что у устойчивого сорта картофеля Хозяюшка (V1) и полученного сомаклонального образца Х94 количество изопероксидаз не увеличивалось, но отмечалось более интенсивное окрашивание полос у инфицированного образца по сравнению с контролем, что свидетельствовало об увеличении активности изозимов. Предполагается, что разница в активности изоферментного спектра отмечена между устойчивым и восприимчивым сортами картофеля и полученными от данных сортов сомаклональными образцами, эта разница возможна за счет времени наработки фермента и количества копий фермента. Возможно, у восприимчивого сорта

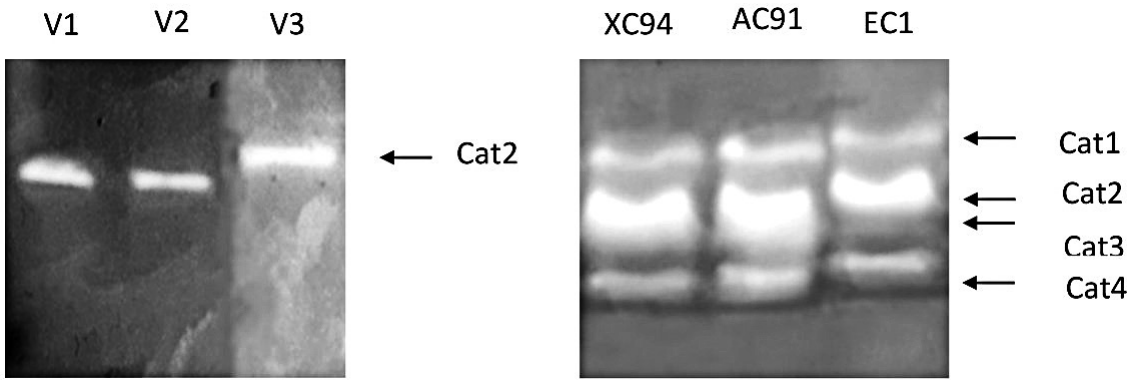


Рис. 6. Определение *in gel* активности изоформ каталазы в листьях картофеля, где V1 – Хозяюшка, V2 – Алена, V3 – Ермак – образцы, экстрагированные из контрольной группы; XC94, AC91, EC1 – образцы, экстрагированные из сомаклональных образцов картофеля; Cat1–Cat 4 – изоферменты каталазы

Fig. 6. Determination of *in gel* activity of catalase isoforms in potato leaves, where V1 is Hostess, V2 is Alena, V3 is Ermak are samples extracted from the control group; XC94, AC91, EC1 – samples extracted from somaclonal potato samples; Cat1–Cat 4 – catalase isoenzymes

и полученного сомаклона EC1 фермент синтезировался медленнее, в отличие от устойчивого и умеренно устойчивого сортов. Результаты, полученные нами при исследовании изменения активности и спектров пероксидазы у растений картофеля при инфицировании мозаичным вирусом картофеля, согласуются с исследованиями, проводимыми И.А. Грасковой [21]. У устойчивого сорта Хозяюшка и его сомаклонального образца происходила активация изопероксидаз, и на геле наблюдали интенсификацию окраски полос, что свидетельствовало об увеличении активности фермента, а также о дальнейшем своевременном запуске сигнальных механизмов. В то время как у чувствительного сорта картофеля Ермак и его сомаклона EC1 требовалось более длительное время для формирования иммунного ответа. Следует отметить, что у образца EC1 наблюдался синтез 2-х дополнительных изоформ фермента, что возможно связано с сомаклональной изменчивостью у полученного сомаклонального образца картофеля и исходного сорта Ермак.

При изучении спектров каталазы у сортов Алена, Ермак и Хозяюшка наблюдали активность одной изоформы каталазы, обозначенной Cat1. У сомаклонов картофеля AC91 и XC91, инфицированных вирусом дополнительно к изоформе Cat1, обнаруженной в образцах контрольной группы растений, произошла активация дополнительных изоформ, которые были обозначены как Cat2, Cat4. У сомаклонального образца EC1 отмечена активность 4-й формы каталазы Cat3, которая отсутствовала у образцов AC91 и XC94 (рис. 6).

Верхняя полоса с молекулярной массой 78 кДа была условно обозначена как Cat1. Среднюю полосу с большей активностью и меньшей молекулярной массой 58 кДа обозначили как Cat2. Изоформа Cat3 имела молекулярную массу не более 55 кДа. Следует отметить, что на электрофореграмме у инфицированных растений была обнаружена четвертая изоформа каталазы, условно обозначенная как Cat4, молекулярная масса которой составляла около 48 кДа. Результаты, полученные нами, показали увеличение активности каталазы у всех изучаемых сомаклональных образцов относительно контроля. Однако при этом наблюдался синтез дополнительной изоформы фермента (Cat3, 54кДа), что, возможно, связано с сомаклональной изменчивостью у полученного сомаклонального образца картофеля и исходного сорта. Полученные данные показывают, что в ответ на повышенную аккумуляцию перекиси водорода при вирусной инфекции PVS во всех изучаемых сортах картофеля происходило повышение активности каталазы. При детекции фермента в нативном геле была обнаружена активация дополнительных изоформ, которые не были отмечены в

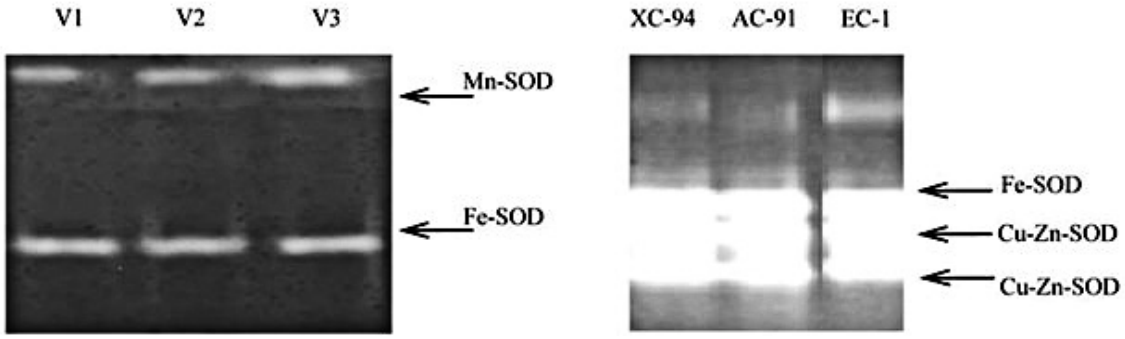


Рис. 7. Определение форм супероксиддисмутазы в листьях картофеля, где V1 – Хозяюшка, V2 – Алена, V3 – Ермак – образцы, экстрагированные из контрольной группы; XC94, AC91, EC1 – образцы, экстрагированные из сомаклональных образцов картофеля

Fig. 7. Determination of superoxide dismutase forms in potato leaves, where V1 is Hostess, V2 is Alena, V3 is Ermak are samples extracted from the control group; XC94, AC91, EC1 – samples extracted from somaclonal potato samples

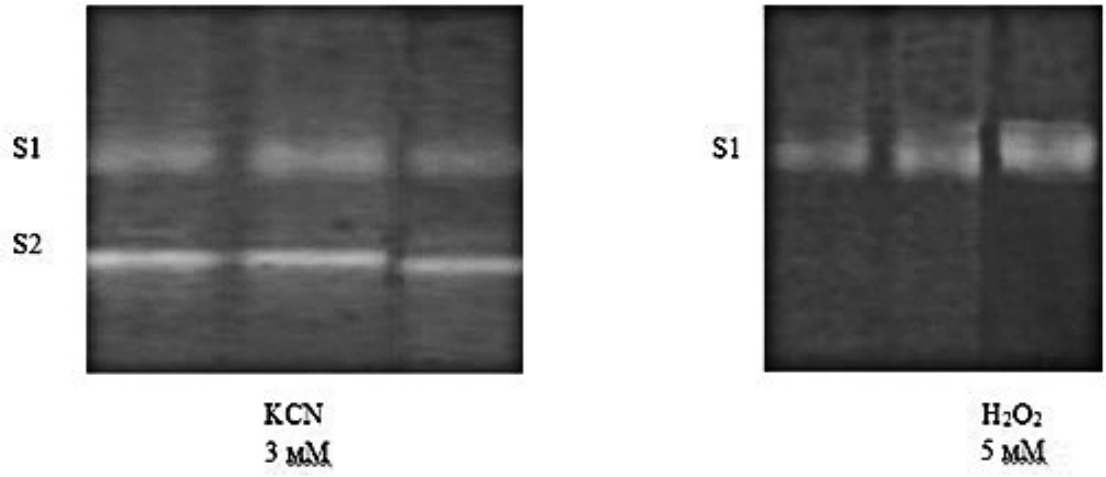


Рис. 8. Определение *in gel* активности форм супероксиддисмутазы в листьях картофеля с ингибиторами 3 мМ KCN и 5 мМ H_2O_2
Fig. 8. Determination of *in gel* activity of superoxide dismutase forms in potato leaves with inhibitors 3 mM KCN and 5 mM H_2O_2

геле контрольного варианта. Наличие нескольких изоформ каталазы было отмечено другими авторами для таких растений, как табак, фасоль, кукуруза, клещевина, хлопок, сосна, арабидопсис и бесцветник [22].

При изучении спектров супероксиддисмутазы у клеток растений картофеля были получены следующие результаты: выявлены в микроклонах две формы фермента – Fe- и Cu/Zn-СОД, которые играют наиболее значимую роль при нейтрализации радикалов (рис. 7).

Изоформа S1 (рис. 8), которая не ингибировалась KCN и H_2O_2, отнесена к Mn-СОД. У контрольных и сомаклональных образцов растений активность изоформы S1 была незначительной, что согласуется с данными по определению активности форм СОД при низкотемпературной адаптации и солевом стрессе картофеля [23].

Форма S2 ингибировалась H_2O_2 и была отнесена к изоформам Fe-СОД. Следует отметить, что активность Fe-СОД у инфицированных сомаклональных образцов была выше по сравнению с контрольными растениями, она проявлялась на геле более интенсивной окраской полос. Кроме того, у сомаклонов картофеля, зараженных вирусной инфекцией, наблюдали появление 2-х изоформ супероксиддисмутазы – S3 и S4, которые были отнесены к Cu/Zn-СОД. Формы S3 и S4 проявляли интенсивную окраску на геле, что свидетельствовало об их активности. Из полученных данных было установлено, что в результате стрессового воздействия вирусной инфекции отмечалась активность 2-х форм фермента: Fe- и Cu/Zn-СОД, которые играют наиболее значимую роль при формировании антиоксидантной системы и иммунитета растений, их роль в ответных реакциях растений на стресс подтверждается повышенной активностью в условиях действия разных стрессоров [24–26].

У сортов Алена, Ермак и Хозяюшка прослеживалась активность Mn- и Fe-СОД. Результаты, полученные в ходе исследования, свидетельствуют о разной активности антиоксидантных ферментов у изучаемых генотипов картофеля, а также от полученных сомаклональных образцов. Повышенную активность антиоксидантных ферментов отмечали у устойчивого к вирусам сорта Хозяюшка и его сомаклонального образца. Примечательно, что у сомаклона ЕС1, полученного от восприимчивого сорта картофеля Ермак, была отмечена повышенная активность и выявлены дополнительные изоформы у пероксидазы и каталазы, что может быть связано с сомаклональной изменчивостью вследствие длительно культивируемой каллусной ткани и генетических особенностей сорта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты представляют интерес для привлечения отечественных сортов картофеля в селекционный процесс при развитии агропромышленного комплекса г. Омска и Омской области как высокоурожайных и устойчивых к климатическим особенностям региона. Для дальнейшего выведения новых сортов картофеля с комплексом хозяйственно-ценных признаков, таких как устойчивость к вирусам и продолжительность хранения, важно иметь разнообразный исходный материал с богатой генетической основой. Таким образом, для эффективного получения и использования генетических ресурсов и реализации морфогенетического потенциала для получения новых ценных сортовых признаков картофеля необходимо проведение исследований, направленных на изучение активности антиоксидантных ферментов при инфицировании вирусом PVS. Изучение антиоксидантной системы у картофеля является одним из важных направлений селекции и клеточной инженерии растений как для фундаментальных, так и для прикладных исследований. Особое значение оно приобретает при культивировании каллусных тканей картофеля *in vitro*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Muhammad A.F., Adnan K.N., Javaid A., Saifullah, Farooq M., Sour Z., et al. Acquiring control: the evolution of ROS–induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses // Plant Physiology and Biochemistry. 2019. Vol. 141. P. 353–359. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.039.

2. Foyer C.H., Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a reevaluation of the concept of

oxidative stress in a physiological context // Plant, Cell and Environment. 2005. Vol. 28, no. 8. P. 1056–1063. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x.

3. Dietz K.-J., Mittler R., Noctor G. Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling // Plant Physiology. 2016. Vol. 171, no. 3. P. 1535–1539. https://doi.org/10.1104/pp.16.00938.

4. Foyer C.H., Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses // The Plant Cell. 2005. Vol. 17. P. 1866–1872. https://doi.org/10.1105/tpc.105.033589.

5. Bowler C., Montagu M.V., Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 1992. Vol. 43, no. 1. P. 83–116. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.000503.

6. Che Y., Yao T., Wang H., Wang Z., Zhang H., Sun G., et al. Potassium ion regulates hormone, Ca^{2+} and H_2O_2 signal transduction and antioxidant activities to improve salt stress resistance in tobacco // Plant Physiology and Biochemistry. 2022. Vol. 186. P. 40–45. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.06.027.

7. Khalid A., Aftab F. Effect of exogenous application of 24-epibrassinolide on growth, protein contents, and antioxidant enzyme activities of *in vitro*-grown (*Solanum tuberosum* L.) under salt stress // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 2016. Vol. 52. P. 81–91. https://doi.org/10.1007/s11627-015-9745-2.

8. Khan M.I.R., Nazir F., Asgher M., Per T.S., Khan N.A. Selenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium–induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat // Journal of Plant Physiology. 2015. Vol. 173. P. 9–18. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.09.011.

9. Киргизова И.В., Гаджимурадова А.М., Омаров Р.Т. Особенности накопления антиоксидантных ферментов у картофеля в условиях биотического и абиотического стресса // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2018. Т. 8. N 4. С. 42–54. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-4-42-54. EDN: YTDWDJ.

10. Murgan O.K., Kolomeichuk L.V., Kovtun I.S., Efimova, M.V. Response of the antioxidant system of two varieties of potatoes to salt stress // Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology. 2019. Vol. 24. P. 98–105. https://doi.org/10.18699/ICG-PlantGen2019-31.

11. Shafi A., Pal A.K., Sharma V., Kalia S., Kumar S., Ahuja P.S., et al. Transgenic potato plants overexpressing SOD and APX exhibit enhanced lignification and starch biosynthesis with improved salt stress tolerance // Plant Molecular Biology Reporter. 2017. Vol. 35, no. 2. P. 504–511. https://doi.org/10.1007/s11105-017-1041-3.

12. Rahnama H., Ebrahimzadeh H. Antioxidant isozymes activities in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) under salt stress // Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran. 2006. Vol. 17, no. 3. P. 225–232.

13. Ruiz-Sáenz D.R., Ayala-Hernández D.D., Niino T., Cruz-Gutiérrez E.J. Salicylic acid-cryotherapy treatment for elimination of potato Virus S from *Solanum tuberosum* L. // American Journal of Potato Research. 2019. Vol. 96. P. 225–234. https://doi.org/10.1007/s12230-018-09694-4.

14. Балакина А.А., Кунина Ю.В., Терентьев А.А., Калашникова Е.А. Изучение активности ферментов антиоксидантной системы на различных этапах культивирования люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) *in vitro* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2012. N 1. С. 78–83. EDN: OZNBER.

15. Omarov R.T., Sagi M., Lips S.H. Regulation of aldehyde oxidase and nitrate reductase in roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) by nitrogen source and salinity // Journal of Experimental Botany. 1998. Vol. 49, no. 322. P. 897–902. https://doi.org/10.1093/jxb/49.322.897.

16. Chandlee J.M., Scandalios J.G. Gene expression during early kernel development in *Zea mays* // Genes & Development. 1983. Vol. 4. P. 99–128.

17. Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез. М.: Промэкобезопасность, 2004. 98 с.

18. Beauchamp C.H., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gel // Analytical Biochemistry. 1971. Vol. 44. P. 276–279.

19. Khalafalla M.M., Elaleem K.G., Modawi R.S. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant // African Journal of Biotechnology. 2009. Vol. 8, no. 11. P. 234–238. https://doi.org/10.5897/AJB09.014.

20. Kirgizova I.V., Kalashnikova E.A., Turpanova R.M., Gadzhimuradova A.M., Silaev D.V. Levels of physiological activity of antioxidant enzymes in potatoes (*S. tuberosum* L.) when infected PVS virus // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2022. Vol. 1154. P. 012033. https://doi.org/10.1088/1755-1315/1154/1/012033.

21. Граскова И.А., Эпова К.Ю., Кузнецова Е.В., Колесниченко А.В., Войников В.К. Роль слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз в устойчивости картофеля при инфицировании кольцевой гнилью // Journal of Stress Physiology and Biochemistry. 2008. Т. 4. С. 4–12.

22. Corpas F.J., Palma J.M., Sandalio L.M., Lopez-Huertas E., Romero-Puertas M.C., Barroso J.B., et al. Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: identification of five different isoforms // Free Radical Research. 1999. Vol. 31, no. 1. P. 235–240. https://doi.org/10.1080/10715769900301561.

23. Naraikina N.V., Sinkevich M.S., Demin I.N. Changes in the activity of superoxide dismutase isoforms in the course of low-temperature adaptation in potato plants of wild type and transformed with Δ12-acyl-lipid desaturase gene // Russian Journal of Plant Physiology. 2014. Vol. 61. P. 332–338.

24. Saibi W., Brini F. Superoxide dismutase (SOD) and abiotic stress tolerance in plants: an overview. In: Superoxide Dismutase: Structure, Synthesis and Applications. Nova Science Publishers Inc., 2018. P. 101–142.

25. Alscher R.G., Ertuk N., Heath L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants // Journal of Experimental Botany. 2002. Vol. 53, no. 372. P. 1331–1341. https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1331.

26. Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Алиева Г.П. Различия в низкотемпературной устойчивости растений

Arabidopsis thaliana и их нечувствительных к этилену мутантов связаны с активностью антиоксидантных ферментов // Физиология растений. 2020. Т. 67. N 6. С. 661–672. https://doi.org/10.31857/S0015330320050152.

REFERENCES

1. Muhammad A.F., Adnan K.N., Javaid A., Saifullah, Farooq M., Sour Z., et al. Acquiring control: the evolution of ROS–induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2019;141:353-359. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.039.

2. Foyer C.H., Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment.* 2005;28(8):1056-1063. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x.

3. Dietz K.-J., Mittler R., Noctor G. Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling. *Plant Physiology.* 2016;171(3):1535-1539. https://doi.org/10.1104/pp.16.00938.

4. Foyer C.H., Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell.* 2005;17:1866-1872. https://doi.org/10.1105/tpc.105.033589.

5. Bowler C., Montagu M.V., Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 1992;43(1):83-116. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.000503.

6. Che Y., Yao T., Wang H., Wang Z., Zhang H., Sun G., et al. Potassium ion regulates hormone, Ca^{2+} and H_2O_2 signal transduction and antioxidant activities to improve salt stress resistance in tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2022;186:40-45. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.06.027.

7. Khalid A., Aftab F. Effect of exogenous application of 24-epibrassinolide on growth, protein contents, and antioxidant enzyme activities of *in vitro*-grown (*Solanum tuberosum* L.) under salt stress. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant.* 2016;52:81-91. https://doi.org/10.1007/s11627-015-9745-2.

8. Khan M.I.R., Nazir F., Asgher M., Per T.S., Khan N.A. Selenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium–induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat. *Journal of Plant Physiology.* 2015;173:9-18. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.09.011.

9. Kirgizova I.V., Gajimuradova A.M., Omarov R.T. Accumulation of antioxidant enzymes in potato plants under the conditions of biotic and abiotic stress. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2018;8(4):42-54. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-4-42-54. EDN: YTDWDJ.

10. Murgan O.K., Kolomeichuk L.V., Kovtun I.S., Efimova, M.V. Response of the antioxidant system of two varieties of potatoes to salt stress. *Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology.* 2019;24:98-105. https://doi.org/10.18699/ICG-PlantGen2019-31.

11. Shafi A., Pal A.K., Sharma V., Kalia S., Kumar S., Ahuja P.S., et al. Transgenic potato plants overexpressing SOD and APX exhibit enhanced lignification and starch biosynthesis with improved salt stress tolerance. *Plant Molecular Biology Reporter.* 2017;35(2):504-511. https://doi.org/10.1007/s11105-017-1041-3.

12. Rahnama H., Ebrahimzadeh H. Antioxidant isozymes activities in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) under salt stress. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran.* 2006;17(3):225-232.

13. Ruiz-Sáenz D.R., Ayala-Hernández D.D., Niino T., Cruz-Gutiérrez E.J. Salicylic acid-cryotherapy treatment for elimination of potato Virus S from *Solanum tuberosum* L. *American Journal of Potato Research.* 2019;96:225-234. https://doi.org/10.1007/s12230-018-09694-4.

14. Balakina A.A., Kunina Yu.V., Terent'ev A.A., Kalashnikova E.A. Study of the activity of enzymes of the antioxidant system at various stages of the cultivation of narrow-leaved lupine (*Lupinus angustifolius* L.) *in vitro. Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2012;(1):78-83. (In Russian). EDN: OZNBER.

15. Omarov R.T., Sagi M., Lips S.H. Regulation of aldehyde oxidase and nitrate reductase in roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) by nitrogen source and salinity. *Journal of Experimental Botany.* 1998;49(322):897-902. https://doi.org/10.1093/jxb/49.322.897.

16. Chandlee J.M., Scandalios J.G. Gene expression during early kernel development in *Zea mays*. *Genes & Development.* 1983;4:99-128.

17. Pobezhimova T.P., Kolesnichenko A.V., Grabel'nykh O.I. *Methods for studying plant mitochondria. Polarography and electrophoresis.* Moscow: Promekobezopasnost'; 2004. 98 p. (In Russian).

18. Beauchamp C.H., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. *Analytical Biochemistry.* 1971;44:276-279.

19. Khalafalla M.M., Elaleem K.G., Modawi R.S. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. *African Journal of Biotechnology.* 2009;8(11):234-238. https://doi.org/10.5897/AJB09.014.

20. Kirgizova I.V., Kalashnikova E.A., Turpanova R.M., Gadzhimuradova A.M., Silaev D.V. Levels of physiological activity of antioxidant enzymes in potatoes (*S. tuberosum* L.*)* when infected PVS virus. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* 2022;1154:012033. https://doi.org/10.1088/1755-1315/1154/1/012033.

21. Graskova I.A., Epova K.Yu., Kuznetsova E.V., Kolesnichenko A.V., Voinikov V.K. The role of peroxidases that are weakly bound to the cell wall in potato resistance to infection with ring rot. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry.* 2008;4:4-12. (In Russian).

22. Corpas F.J., Palma J.M., Sandalio L.M., Lopez-Huertas E., Romero-Puertas M.C., Barroso J.B., et al. Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: identification of five different isoforms. *Free Radical Research.* 1999;31(1):235-240. https://doi.org/10.1080/10715769900301561.

23. Naraikina N.V., Sinkevich M.S., Demin I.N. Changes in the activity of superoxide dismutase isoforms in the course of low-temperature adaptation in potato plants of wild type and transformed with Δ12-acyl-lipid desaturase gene. *Russian Journal of Plant Physiology.* 2014;61:332-338.

24. Saibi W., Brini F. Superoxide dismutase (SOD) and abiotic stress tolerance in plants: an overview. In: *Superoxide Dismutase: Structure, Synthesis and Applications.* Nova Science Publishers Inc.; 2018, p. 101-142.

25. Alscher R.G., Ertuk N., Heath L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany.* 2002;53(372):1331-1341. https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1331.

26. Sin'kevich M.S., Naraikina N.V., Alieva G.P. Differences in cold tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants and their ethylene-insensitive mutants are associated with the activity of antioxidant enzymes. *Fiziologiya rastenii.* 2020;67(6):661-672. https://doi.org/10.31857/S0015330320050152.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Киргизова Ирина Васильевна,
соискатель,
Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева,
127422, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
Российская Федерация,
✉irina.kz-89@mail.ru
https://orcid.org/ 0000-0002-1816-7963

Калашникова Елена Анатольевна,
д.б.н., профессор,
Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева,
127422, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
Российская Федерация,
kalash0407@mail.ru
https://orcid.org/ 0000-0002-2655-1789

Гаджимурадова Айсарат Махмудовна,
научный сотрудник,
Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина,
010011, г. Астана, пр. Женис, 62,
Республика Казахстан,
aisarat3878@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-1808-4188

Силаев Дмитрий Витальевич,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Национальный центр биотехнологии,
010000, Астана, ул. Шоссе Коргалжын, 13/5,
Республика Казахстан,
dvsilayev@gmail.ru
https://orcid.org/0000-0001-6867-953x

Турпанова Рауза Масгутовна,
к.с-х.н., доцент,
Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева,
010011, г. Астана, ул. Сатпаева, 2,
Республика Казахстан,
rauza_enu@mail.ru
https://orcid.org/0009-0009-1014-0633

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina V. Kirgizova,
Applicant,
Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
49, Timiryazevskaya St., Moscow, 127422,
Russian Federation,
✉irina.kz-89@mail.ru
https://orcid.org/ 0000-0002-1816-7963

Elena A. Kalashnikova,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
49, Timiryazevskaya St., Moscow, 127422,
Russian Federation,
kalash0407@mail.ru
https://orcid.org/ 0000-0002-2655-1789

Aisarat M. Gadzhimyradova,
Researcher,
S. Seifullin Kazakh Agro Technical Research University,
62, Zhenis Ave., Astana, 010011,
Republic of Kazakhstan,
aisarat3878@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-1808-4188

Dmitry V. Silaev,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
National Center for Biotechnology,
13/5, Korgalzhyn Road, Astana, 010000,
Republic of Kazakhstan,
dvsilayev@gmail.ru
https://orcid.org/0000-0001-6867-953x

Rauza M. Turpanova,
Cand. Sci. (Agriculture), Associate Professor,
L.N. Gumilyov Eurasian National University,
2, Satpayev St., Astana, 010011,
Republic of Kazakhstan,
rauza_enu@mail.ru
https://orcid.org/0009-0009-1014-0633

Жангазин Саян Берикович,
доктор наук, и.о. доцента,
Евразийский национальный университет
им. Л.Н. Гумилева,
010011, г. Астана, ул. Сатпаева, 2,
Республика Казахстан,
zhangazin_sayan@mail.ru
https://orcid.org/ 0000-0002-5813-8331

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 09.03.2023.
Одобрена после рецензирования 06.08.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

Sayan B. Zhangazin,
PhD, Acting Associate Professor,
L.N. Gumilyov Eurasian National University,
2, Satpayev St., Astana, 010011,
Republic of Kazakhstan,
zhangazin_sayan@mail.ru
https://orcid.org/ 0000-0002-5813-8331

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

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.

Информация о статье

The article was submitted 09.03.2023.
Approved after reviewing 06.08.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.

Краткие сообщения
УДК 544.77.051.7
EDN: MUMYAI
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-454-460

Получение наночастиц mcl-полигидроксиалканоатов, стабилизированных неионогенным детергентом Tween 80

И.Н. Зубков*,✉, В.В. Высочинская*,***, А.В. Кашина****, С.М. Шишлянников*,*****

**Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация*
***Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал «ФНЦ Пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация*
****Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация*
*****Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация*

Аннотация. *Наночастицы на основе биоразлагаемых полимеров находят множество применений в медицине как средства внутриклеточной доставки лекарственных препаратов. Одними из самых перспективных полимеров липидной природы являются поли-3-гидроксиалканоаты, получаемые биосинтетическим путем. Наиболее широко применяются полигидроксибутират и полигидроксивалерат (scl-поли-3-гидроксиалканоаты), которые растворимы только в хлорорганических растворителях. Использование хлорорганических растворителей сопряжено с рядом трудностей, т.к. они оказывают канцерогенное действие на организм человека. Однако поли-3-гидроксиалканоаты, состоящие из остатков гидроксижирных кислот с 6–14 атомами углерода в главной цепи (mcl-поли-3-гидроксиалканоаты), растворимы не только в хлороформе или дихлорметане, но и в предельных углеводородах. Углеводороды (например, н-гексан) легко отделяются от водных растворов и не обладают высокой цитотоксичностью. Следовательно, использование mcl-поли-3-гидроксиалканоатов позволяет исключить возможность загрязнения готовой лекарственной формы хлорорганическими соединениями. Предложена методика синтеза наночастиц mcl-поли-3-гидроксиалканоатов, стабилизированных неионогенным детергентом Tween 80. Оптимизировано соотношение между концентрацией поли-3-гидроксиалканоата и детергента. Показано, что получаемые частицы имеют средний размер 200±90 нм и электрокинетический потенциал -17±5 мВ. Изучена стабильность раствора частиц при температуре 4 °С. Установлено, что наночастицы не изменяют размер и электрокинетический потенциал в течение 90 дней при температуре 4 °С. Методом флуоресцентной микроскопии показана возможность их доставки в клетки линии ВНК-21 в течение 2 ч. При концентрации до 200 мкг/мл получаемые наночастицы не оказывают токсического действия на клетки ВНК-21.*

Ключевые слова: *полигидроксиалканоаты, наночастицы, Tween 80, ВНК-21, цитотоксичность*

Финансирование. *Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект 23-25-00165).*

Для цитирования: Зубков И.Н., Высочинская В.В., Кашина А.В., Шишлянников С.М. Получение наночастиц mcl-полигидроксиалканоатов, стабилизированных неионогенным детергентом Tween 80 // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 454–460. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-454-460. EDN: MUMYAI.

Brief communication

Preparation of mcl-polyhydroxyalkanoate nanoparticles stabilized by the Tween 80 nonionic surfactant

Ilya N. Zubkov*,✉, Vera V. Vysochinskaya*,***, Anna V. Kashina****, Sergey M. Shishlyannikov*,*****

**Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russian Federation*
***All-Russian Research Institute for Food Additives, Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems (RAS), Saint Petersburg, Russian Federation*
****Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russian Federation*

© Зубков И.Н., Высочинская В.В., Кашина А.В., Шишлянников С.М., 2023

****Institute of Macromolecular Compounds of RAS, Saint Petersburg, Russian Federation

Abstract. *Nanoparticles based on biodegradable polymers find numerous applications in medicine as substances for intracellular drug delivery. Biosynthetically produced poly-3-hydroxyalkanoates (P3HAs) are among the most promising polymers of a lipid nature. In particular, polyhydroxybutyrate and polyhydroxyvalerate (scl-poly-3-hydroxyalkanoates) are widely used compounds, which are soluble only in organochlorine solvents. The use of organochlorine solvents faces several obstacles, since such chemicals may exhibit carcinogenic effects on the human body. However, the P3Has compounds consisting of hydroxybutyric acid residues with 6–14 carbon atoms in the main chain (mcl-poly-3-hydroxyalkanoates) are soluble not only in $CHCl_3$ or CH_2Cl_2 but also in paraffins. These hydrocarbons, such as n-hexane, can be easily separated from aqueous solutions and are not known to exhibit high cytotoxicity. Consequently, the application of mcl-poly-3-hydroxyalkanoates can prevent the contamination of prepared dosage forms with organochlorine compounds. To this end, a methodology for the synthesis of mcl-P3HA nanoparticles stabilized with the Tween 80 nonionic surfactant was proposed. The ratio between the concentration of P3HA and the detergent was optimized. The present study revealed that the obtained particles have an average size of 200±90 nm and a zeta potential of -17±5 mV. Upon investigating the stability of the particle solution at 4 °C, it was found that the nanoparticles did not alter their size and zeta potential for 90 days. The fluorescence microscopy method showed that they could be delivered into BHK-21 cells within 2 h. In addition, the nanoparticles synthesized had no toxic effect on BHK-21 cells at a concentration of up to 200 μg/mL.*

Keywords: *Polyhydroxyalkanoates, nanoparticles, Tween 80, BHK-21, cytotoxicity*

Funding. *The work was financially supported by the Russian Science Foundation (project 23-25-00165).*

For citation: Zubkov I.N., Vysochinskaya V.V., Kashina A.V., Shishlyannikov S.M. Preparation of mcl-polyhydroxyalkanoate nanoparticles stabilized by the Tween 80 nonionic surfactant. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2023;13(3):454-460. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-454-460. EDN: MUMYAI.

ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы, состоящие из биоразлагаемых полимеров, с каждым годом все шире применяются в качестве средств доставки лекарственных препаратов [1]. Для получения наночастиц используют различные природные и синтетические полимеры, такие как белки (например, альбумин и желатин [2]), полисахариды (хитозан, целлюлозу или крахмал [3]), а также продукты конденсации органических кислот – полигликолид, полилактид и поли-3-гидроксиалканоат (ПГА) [4]. В отличие от полисахаридов и полипептидов, полимеры липидной природы способны образовывать комплексы с гидрофобными лекарственными препаратами, такими как доксорубицин [5], рапамицин [6] и азатиоприн [7]. Одним из наиболее перспективных материалов для создания средств доставки лекарственных препаратов на основе полимерных наночастиц является ПГА [8]. ПГА деградирует в организме человека с образованием нетоксичных продуктов – 3-гидроксижирных кислот [9]. В зависимости от числа атомов углерода в главной цепи мономеров ПГА принято классифицировать на короткоцепочечные (scl-ПГА, состоят из остатков гидроксибутирата и гидроксивалерата), ПГА со средней длиной мономерных звеньев (mcl-ПГА, C_6-C_{14}) и длинноцепочечные (lcl-ПГА) с 15 и более атомами углерода в главной цепи мономеров [10]. Наиболее изученными являются scl-ПГА и частицы на их основе [8]. Главным недостатком scl-ПГА является слабая растворимость в нехлорированных органических растворителях [11]. При получении частиц scl-ПГА растворяют в хлороформе или дихлорметане, которые оказывают канцерогенное действие на организм человека [12]. В отличие от scl-ПГА, mcl-ПГА хорошо растворимы в углеводородах, которые не обладают значимой токсичностью и легко отделяются от водных растворов [13]. Для стабилизации наночастиц, состоящих из гидрофобных полимеров, используют нетоксичные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль [8], поливинилацетат [14] и полисорбат (например, Tween 80) [15]. В отличие от многих полимерных стабилизаторов, Tween 80 быстро выводится из организма человека и допущен к применению в составе вакцин [16].

Целью представленной работы была разработка метода синтеза стабилизированных Tween 80 наночастиц mcl-ПГА, а также изучение их доставки внутрь клеток эукариот и цитотоксичности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использованные в работе органические растворители, Tween 80 и вода имели степень чистоты analytical grade (Merck, Германия). Образец mcl-ПГА был получен биосинтетическим путем с помощью *Pseudomonas helmanticensis* P1 согласно методике [17]. Выделенный согласно методике [18] образец полимера состоял из остатков гидроксигексаноата (6%), гидроксиоктаноата (49%), гидроксидеканоата (26%) и гидроксидодеканоата (24%), имел средневесовую молекулярную массу 100 кДа и среднечисловую молекулярную массу 67 кДа.

В работе использовали перевиваемую культуру клеток BHK-21 (фибробласты почки сирийского хомячка), полученную из банка клеточных культур ATCC (Американская типовая коллекция клеточных культур, США). Клетки BHK-21 культивировали на питательной среде MEM (Gibco, США) с добавлением 4 мМ L-глутамина и 10% FBS (Gibco, США). Все эксперименты проводили без добавления антибиотиков. Для проведения экспериментов использовали суточный монослой. Все клеточные культуры поддерживали при температуре 37 °C и 5% CO_2.

Для получения наночастиц 20 мкл 2%-го раствора ПГА в *н*-гексане смешивали с 20 мкл водного

раствора Tween 80 с концентрацией 0,02–0,4% и подвергали смесь воздействию ультразвука в диспергаторе (22 кГц, 150 Вт) в течение 5 мин. Водный слой отбирали и разбавляли водой в 10 раз. К 50 мкл разбавленного раствора частиц для изучения проникновения в клетки эукариот добавляли 2,5 мкл раствора нильского красного в ацетоне (40 мкг/мл). Распределение частиц по размеру и электрокинетический потенциал измеряли методом динамического рассеяния света на установке Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Великобритания).

Для изучения доставки полученных частиц за день до эксперимента клетки BHK-21 рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве $1{,}5\times10^4$ на лунку для достижения 80–90% монослоя в день эксперимента. К клеткам BHK-21 добавляли приготовленный раствор частиц непосредственно в ростовую среду с 10% FBS в объеме 10 мкл на лунку 96-луночного планшета и инкубировали в течение 2 ч. Клетки промывали изотоническим фосфатным буферным раствором и окрашивали красителями NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, США) и CellMask™ Plasma Membrane Stains (Thermo Fisher Scientific, США) для визуализации ядерных и мембранных структур согласно методике производителя. Флуоресцентные микрофотографии клеточных культур получали с помощью Cytell Imaging System (Image Solutions, Великобритания).

Для изучения цитотоксичности метаболическую активность клеток BHK-21 после добавления полученных частиц измеряли с помощью колориметрического MTS-теста (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), Promega, США) согласно инструкции производителя. Клетки BHK-21 рассеивали в 96-луночный планшет в количестве $1{,}5\times10^4$/лунку для достижения 90% суточного монослоя. Добавляли 10 мкл раствора частиц в рассчитанных концентрациях и культивировали в течение 24 ч при температуре 37 °C и 5% CO_2. После инкубирования в каждую лунку добавляли по 20 мкл раствора MTS и продолжали инкубацию в течение 2 ч. Оптическую плотность растворов при 490 нм измеряли с помощью планшетного спектрофотометра CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). Метаболическую активность клеток определяли по формуле:

$$m.a. = \frac{OD_{P+} - OD_K}{OD_{P-} - OD_K} \cdot 100\%$$

где *m.a.* – метаболическая активность клеток BHK-21; OD_{P+} – поглощение лунки, содержащей обработанные частицами mcl-ПГА клетки BHK-21; OD_{P-} – поглощение лунки, содержащей клетки BHK-21 без добавления частиц; OD_K – фоновое поглощение лунки с растворителем.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Зависимость размера частиц и их электрокинетического потенциала от концентрации Tween 80 в реакционной среде представлена в таблице. Наименьший гидродинамический диаметр частиц (200 нм) наблюдается при соотношении концентраций ПГА и Tween 80 20:1. При увеличении концентрации Tween 80 в растворе наблюдается рост среднего диаметра частиц, вызываемый, по всей видимости, образованием многослойных структур [19]. При концентрациях Tween 80 0,04 и 0,02% диаметр частиц также повышается: вероятнее всего, это обусловлено низкой стабильностью частиц и их агрегацией из-за недостатка детергента. Таким образом, 0,1% Tween 80 способствует образованию частиц наименьшего диаметра, которые лучше проникают внутрь клетки [20]. Снижение электрокинетического потенциала по сравнению с контрольным образцом, вероятно, обусловлено наличием в молекулах ПГА отрицательно заряженных концевых карбоксильных групп.

Средний диаметр частиц и их электрокинетический потенциал, измеренные методом динамического светорассеяния. Доверительные интервалы рассчитаны с помощью t-критерия Стьюдента. *Tween* – концентрация Tween 80 (%), *PHA/Tween* – соотношение концентраций ПГА и Tween 80, *d* – диаметр частиц (нм), *ζ* – электрокинетический потенциал (мВ), *контроль* – контрольный образец (0,1% водный раствор Tween 80)

Mean diameter of the particles and their electrokinetic potential measured by dynamic light scattering. Confidence intervals are calculated using the Student t-test. *Tween* – Tween 80 concentration (%), *PHA/Tween* – ratio between PHA and Tween 80 concentrations, *d* – diameter of the particles (nm); *ζ*– electrokinetic potential (mV); *Control* – control sample (0,1% aqueous Tween 80)

Tween, %	*PHA/Tween*	*d, нм*	*ζ, мВ*
0,4	5	340 ± 180	-15±6
0,2	10	270 ± 140	-14±6
0,1	20	200 ± 90	-17±5
0,04	50	460 ± 200	-10±6
0,02	100	850 ± 300	-8±7
Контроль		130 ± 20	-5±3

Показано, что при хранении в течение 90 дней (4 °C) раствора наночастиц, в которых соотношение ПГА к Tween 80 составляет 20:1, не наблюдается изменения их размера и электрокинетического потенциала. Таким образом, Tween 80 обеспечивает высокую агрегативную устойчивость наночастиц ПГА, делая их перспективными с точки зрения технологии производства.

На рис. 1 представлена флуоресцентная микрофотография клеток BHK-21, инкубированных с окрашенными нильским красным частицами (оранжево-красное свечение). Поглощение частиц клетками происходит в течение 2 ч, а наблюдаемое увеличение их метаболической активности (рис. 2) при концентрации ПГА до 200 мкг/мл связано, по всей видимости, с расщеплением ПГА эндогенными липазами и использованием 3-гидроксижирных кислот в качестве источника углерода и энергии. При концентрации ПГА 400 мкг/мл метаболическая активность клеток снижается, что может быть обусловлено токсичностью Tween 80 (его концентрация составляет 20 мкг/мл) [21].

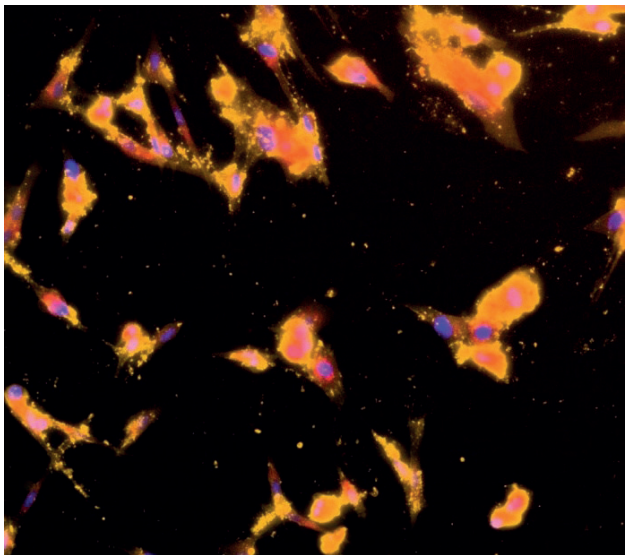


Рис. 1. Флуоресцентная микрофотография клеток ВНК-21, обработанных окрашенными нильским красным частицами. Красный – частицы поли-3-гидроксиалканоата, желтый – мембраны, голубой – ядро

Fig. 1. Fluorescent microphotograph of BHK-21 cells incubated with the nile red stained particles. Red, PHA particles; yellow, membranes; blue, nucleus

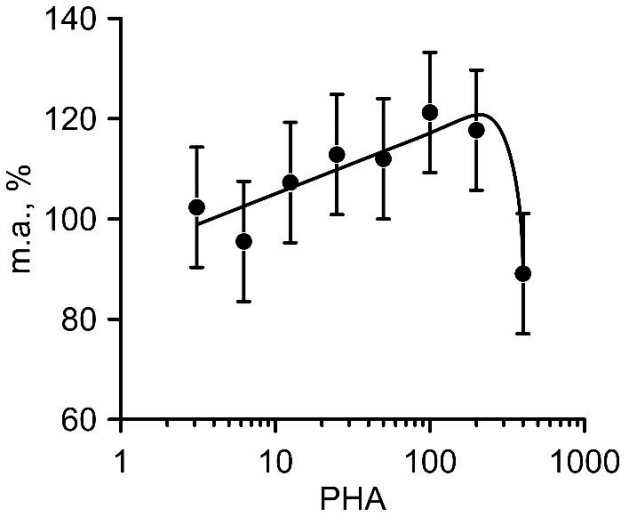


Рис. 2. Зависимость метаболической активности клеток ВНК-21 (*m.a.*) от концентрации частиц (PHA, мкг/мл), измеренная на фоне контрольного образца. Доверительные интервалы рассчитаны с использованием t-критерия Стьюдента

Fig. 2. Dependence of BHK-21 cells metabolic activity (*m. a.*) on particles concentration (PHA, μg/mL) measured against control. Confidence intervals are calculated using the Student t-test

ВЫВОДЫ

Предложена методика получения стабилизированных Tween 80 наночастиц mcl-ПГА без использования хлорорганических растворителей. Установлено, что соотношение концентраций ПГА и Tween 80 20:1 обеспечивает образование частиц наименьшего диаметра. Получаемый раствор наночастиц может храниться до 3 месяцев при температуре 4 °C. Показано, что получаемые частицы способны проникать внутрь клеток линии ВНК-21 и при концентрации до 200 мкг/мл не обладают значимой цитотоксичностью.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Gagliardi A., Giuliano E., Venkateswararao E., Fresta M., Bulotta S., Awasthi V., et al. Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery to solid tumors // Frontiers in Pharmacology. 2021. Vol. 12. P. 601–626. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626.

2. Herrera D.A., Ashai N., Perez-Soler R., Cheng H. Nanoparticle albumin bound-paclitaxel for treatment of advanced non-small cell lung cancer: an evaluation of the clinical evidence // Expert Opinion on Pharmacotherapy. 2019. Vol. 20, no. 1. P. 95–102. https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1546290.

3. Safdar R., Omar A.A., Arunagiri A., Regupathi I., Thanabalan M. Potential of chitosan and its derivatives for controlled drug release applications – a review // Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2019. Vol. 49. P. 642–659. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.020.

4. Maity S., Chakraborti A.S. Formulation, physicochemical characterization and antidiabetic potential of naringenin-loaded poly D, L lactide-co-glycolide (N-PLGA) nanoparticles // European Polymer Journal. 2020. Vol. 134. P. 109818. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109818.

5. Maksimenko O., Malinovskaya Yu., Shipulo E., Osipova N., Razzhivina V., Arantseva D., et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastomas: towards the pharmaceutical development // International Journal of Pharmaceutics. 2019. Vol. 572. P. 118733. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118733.

6. Lu X.-Yu., Li M.-C., Zhu X.-L., Fan F., Wang L.-L., Ma J.-G. Microbial synthesized biodegradable PHBHHxPEG hybrid copolymer as an efficient intracellular delivery nanocarrier for kinase inhibitor // BMC Biotechnology. 2014. Vol. 14. P. 4. https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-4.

7. Hu J., Wang M., Xiao X., Zhang B., Xie Q., Xu X., et al. A novel long-acting azathioprine polyhydroxyalkanoate nanoparticle enhances treatment efficacy for systemic lupus erythematosus with reduced side effects // Nanoscale. 2020. Vol. 12. P. 10799–10808. https://doi.org/10.1039/D0NR01308K.

8. Prakash P., Lee W.-H., Loo C.-Ye., Wong H.S.J., Parumasivam T. Advances in polyhydroxyalkanoate nanocarriers for effective drug delivery: an overview and challenges // Nanomaterials. 2022. Vol. 12, no. 1. P. 175. https://doi.org/10.3390/nano12010175.

9. Miu D.M., Eremia M.C., Moscovici M. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) as biomaterials in tissue engineering: production, isolation, characterization // Materials. 2022. Vol. 15, no. 4. P. 1410. https://doi.org/10.3390/ma15041410.

10. Sehgal R., Gupta R. Polyhydroxyalkanoate and its efcient production: an eco-friendly approach towards development // 3 Biotech. 2020. Vol. 10. P. 549. https://doi.org/10.1007/s13205-020-02550-5.

11. Jacquel N., Lo C.-W., Wu H.-S., Wei Yu-H., Wang S.S. Solubility of polyhydroxyalkanoates by experiment and

thermodynamic correlations // Thermodynamics. 2007. Vol. 53, no. 10. P. 2704–2714.
https://doi.org/10.1002/aic.11274.

12. Axelson O. Chlorinated hydrocarbons and cancer: epidemiologic aspects // Journal of Toxicology and Environmental Health. 1980. Vol. 6, no. 5-6. P. 1245–1251. https://doi.org/10.1080/15287398009529943.

13. Reddy V.U.N., Ramanaiah S.V., Reddy M.V., Chang Yo.-C. Review of the developments of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) // Bioengineering. 2022. Vol. 9, no. 5. P. 225.
https://doi.org/10.3390/bioengineering9050225.

14. Shirmard L.R., Javan N.B., Khoshayand M.R., Kebriaee-zadeh A., Dinarvand R., et al. Nanoparticulate fingolimod delivery system based on biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): design, optimization,characterization and in-vitro evaluation // Pharmaceutical Development and Technology. 2017. Vol. 22, no. 7. P. 860–870.
https://doi.org/10.3109/10837450.2015.1108982.

15. Pachiyappan S., Selvanantham D.S., Kuppa S.S., Chandrasekaran S., Samrot A.V. Surfactant-mediated synthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) nanoparticles for sustained drug delivery // IET Nanobiotechnology. 2019. Vol. 13, no. 4. P. 414–425.
https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5053.

16. Ravichandran V., Lee M., Cao T.G.N., Shim M.S. Polysorbate-based drug formulations for brain-targeted drug delivery and anticancer therapy // Applied Sciences. 2021. Vol. 11, no. 19. P. 9336.
https://doi.org/10.3390/app11199336.

17. Зубков И.Н., Букин Ю.С., Сорокоумов П.Н., Шишлянников С.М. Получение полигидроксиалканоата с помощью культуры *Pseudomonas helmanticensis* в нестерильных средах, содержащих глицерин и додецилсульфат натрия // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 479–484. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-479-484. EDN: HFSIOR.

18. Rebocho A.T., Pereira J.R., Freitas F., Neves L.A., Alves V.D., Sevrin C., et al. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas citronellolis* grown in apple pulp waste // Applied Food Biotechnology. 2019. Vol. 6, no. 1. P. 71–82. http://dx.doi.org/10.22037/afb.v6i1.21793.

19. Thakkar M., Brijesh S. Physicochemical investigation and *in vivo* activity of anti-malarial drugs co-loaded in Tween 80 niosomes // Journal of Liposome Research. 2018. Vol. 28, no. 4. P. 315–321.
https://doi.org/10.1080/08982104.2017.1376684.

20. Prabha S., Arya G., Chandra R., Ahmed B., Nimesh S. Effect of size on biological properties of nanoparticles employed in gene delivery // Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 2016. Vol. 44, no. 1. P. 83–91.
https://doi.org/10.3109/21691401.2014.913054.

21. Arechabala B., Coiffard C., Rivalland P., Coiffard L.J.M., de Roeck-Holtzhauer Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release // Journal of Applied Toxicology. 1999. Vol. 19, no. 3. P. 163–165.
https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199905/06)19:3<163::AID-JAT561>3.0.CO;2-H

REFERENCES

1. Gagliardi A., Giuliano E., Venkateswararao E., Fresta M., Bulotta S., Awasthi V., et al. Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery to solid tumors. *Frontiers in Pharmacology.* 2021;12:601-626.
https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626.

2. Herrera D.A., Ashai N., Perez-Soler R., Cheng H. Nanoparticle albumin bound-paclitaxel for treatment of advanced non-small cell lung cancer: an evaluation of the clinical evidence. *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 2019;20(1):95-102.
https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1546290.

3. Safdar R., Omar A.A., Arunagiri A., Regupathi I., Thanabalan M. Potential of chitosan and its derivatives for controlled drug release applications – a review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2019;49:642-659.
https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.020.

4. Maity S., Chakraborti A.S. Formulation, physico-chemical characterization and antidiabetic potential of naringenin-loaded poly D, L lactide-co-glycolide (N-PLGA) nanoparticles. *European Polymer Journal.* 2020;134:109818.
https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109818.

5. Maksimenko O., Malinovskaya Yu., Shipulo E., Osipova N., Razzhivina V., Arantseva D., et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastomas: towards the pharmaceutical development. *International Journal of Pharmaceutics.* 2019;572:118733.
https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118733.

6. Lu X.-Yu., Li M.-C., Zhu X.-L., Fan F., Wang L.-L., Ma J.-G. Microbial synthesized biodegradable PHBHHxPEG hybrid copolymer as an efficient intracellular delivery nanocarrier for kinase inhibitor. *BMC Biotechnology.* 2014;14:4.
https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-4.

7. Hu J., Wang M., Xiao X., Zhang B., Xie Q., Xu X., et al. A novel long-acting azathioprine polyhydroxyalkanoate nanoparticle enhances treatment efficacy for systemic lupus erythematosus with reduced side effects. *Nanoscale*. 2020;12:10799-10808.
https://doi.org/10.1039/D0NR01308K.

8. Prakash P., Lee W.-H., Loo C.-Ye., Wong H.S.J., Parumasivam T. Advances in polyhydroxyalkanoate nanocarriers for effective drug delivery: an overview and challenges. *Nanomaterials.* 2022;12(1):175.
https://doi.org/10.3390/nano12010175.

9. Miu D.M., Eremia M.C., Moscovici M. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) as biomaterials in tissue engineering: production, isolation, characterization. *Materials.* 2022;15(4):1410. https://doi.org/10.3390/ma15041410.

10. Sehgal R., Gupta R. Polyhydroxyalkanoate and its efcient production: an eco-friendly approach towards development. *3 Biotech*. 2020;10:549.
https://doi.org/10.1007/s13205-020-02550-5.

11. Jacquel N., Lo C.-W., Wu H.-S., Wei Yu-H., Wang S.S. Solubility of polyhydroxyalkanoates by experiment and thermodynamic correlations. *Thermodynamics.* 2007;53(10):2704-2714.
https://doi.org/10.1002/aic.11274.

12. Axelson O. Chlorinated hydrocarbons and cancer: epidemiologic aspects. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* 1980;6(5-6):1245-1251.
https://doi.org/10.1080/15287398009529943.

13. Reddy V.U.N., Ramanaiah S.V., Reddy M.V., Chang Yo.-C. Review of the developments of bacterial medium-chain-length

polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs). *Bioengineering.* 2022;9(5):225. https://doi.org/10.3390/bioengineering9050225.

14. Shirmard L.R., Javan N.B., Khoshayand M.R., Kebriaee-zadeh A., Dinarvand R., et al. Nanoparticulate fingolimod delivery system based on biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): design, optimization, characterization and in-vitro evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology.* 2017;22(7):860-870. https://doi.org/10.3109/10837450.2015.1108982.

15. Pachiyappan S., Selvanantham D.S., Kuppa S.S., Chandrasekaran S., Samrot A.V. Surfactant-mediated synthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) nanoparticles for sustained drug delivery. *IET Nanobiotechnology.* 2019;13(4):414-425. https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5053.

16. Ravichandran V., Lee M., Cao T.G.N., Shim M.S. Polysorbate-based drug formulations for brain-targeted drug delivery and anticancer therapy. *Applied Sciences.* 2021;11(19):9336. https://doi.org/10.3390/app11199336.

17. Zubkov I.N., Bukin Yu.S., Sorokoumov P.N., Shishlyannikov S.M. Preparation of polyhydroxyalkanoates using *Pseudomonas helmanticensis* in non-sterile media containing glycerol and sodium dodecyl sulfate. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):479-484. (In Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-479-484. EDN: HFSIOR.

18. Rebocho A.T., Pereira J.R., Freitas F., Neves L.A., Alves V.D., Sevrin C., et al. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas citronellolis* grown in apple pulp waste. *Applied Food Biotechnology*. 2019;6(1):71-82. http://dx.doi.org/10.22037/afb.v6i1.21793.

19. Thakkar M., Brijesh S. Physicochemical investigation and *in vivo* activity of anti-malarial drugs co-loaded in Tween 80 niosomes. *Journal of Liposome Research.* 2018;28(4):315-321. https://doi.org/10.1080/08982104.2017.1376684.

20. Prabha S., Arya G., Chandra R., Ahmed B., Nimesh S. Effect of size on biological properties of nanoparticles employed in gene delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology.* 2016;44(1):83-91. https://doi.org/10.3109/21691401.2014.913054.

21. Arechabala B., Coiffard C., Rivalland P., Coiffard L.J.M., de Roeck-Holtzhauer Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *Journal of Applied Toxicology.* 1999;19(3):163-165. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199905/06)19:3<163::AID-JAT561>3.0.CO;2-H

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Зубков Илья Николаевич,
специалист,
Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 15/17, Российская Федерация;
лаборант-исследователь,
Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал «ФНЦ Пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, 191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55, Российская Федерация,
zub-i@bk.ru
✉https://orcid.org/0000-0002-6533-8139

Высочинская Вера Валерьевна,
научный сотрудник,
Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 15/17, Российская Федерация;
младший научный сотрудник,
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29, Российская Федерация,
veravv2509@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-3533-2606

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ilya N. Zubkov,
Specialist,
Smorodintsev Research Institute of Influenza, 15/17, Prof. Popov St., Saint Petersburg, 197022, Russian Federation;
Laboratory Assistant,
All-Russian Research Institute for Food Additives, Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems RAS, 55, Liteinyi Ave., St. Petersburg, 191014, Russian Federation,
zub-i@bk.ru
✉https://orcid.org/0000-0002-6533-8139

Vera V. Vysochinskaya,
Researcher,
Smorodintsev Research Institute of Influenza, 15/17, Prof. Popov St., Saint-Petersburg, 197022, Russian Federation;
Junior Researcher,
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 29, Politekhnicheskaya St., Saint Petersburg, 195251, Russian Federation,
veravv2509@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-3533-2606

Кашина Анна Вячеславовна,
к.х.н., старший научный сотрудник,
Институт высокомолекулярных соединений РАН,
199004, г. Санкт-Петербург,
Большой пр-т Васильевского острова, 31,
Российская Федерация,
kashina.anna@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-4119-8191

Шишлянников Сергей Михайлович,
к.б.н., научный сотрудник,
Научно-исследовательский институт гриппа
им. А.А. Смородинцева Минздрава России,
197022, г. Санкт-Петербург,
ул. Проф. Попова, 15/17, Российская Федерация;
доцент,
Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого,
195251, г. Санкт-Петербург,
ул. Политехническая, 29,
Российская Федерация,
sershilin@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-6377-7445

Anna V. Kashina,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
Institute of Macromolecular Compounds RAS,
31, Bolshoy pr. V.O., Saint Petersburg, 199004,
Russian Federation,
kashina.anna@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-4119-8191

Sergey M. Shishlyannikov,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Smorodintsev Research Institute of Influenza,
15/17, Prof. Popov St., Saint Petersburg, 197022,
Russian Federation;
Associate Professor,
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic
University,
29, Politekhnicheskaya St., Saint Petersburg,
195251, Russian Federation,
sershilin@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-6377-7445

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict interests

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

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

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

Информация о статье

Поступила в редакцию 09.08.2023.
Одобрена после рецензирования 12.09.2023.
Принята к публикации 15.09.2023.

Information about the article

The article was submitted 09.08.2023.
Approved after reviewing 12.09.2023.
Accepted for publication 15.09.2023.

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: Russian Science Citation Index (RSCI), 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 (VAK). The Journal also is indexing in Russian Science Citation Index (RSCI), 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 13 N 3 (46) 2023

12+

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
Volume 13 No. 3 (46) 2023

Редактор Л.М. Щепина

Перевод на английский язык:
М. А. Жернаков, Н.Г. Попова, Т. А. Beavitt, Е.А. Привалова

Верстка Т.С. Жевлакова

Дата выхода в свет 30.09.2023. Формат 60 х 90 / 8.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 18,5.
тираж 500 экз. Зак. 106. Поз. плана 5н.

Отпечатано в типографии издательства
ФГБОУ ВО «ИРНИТУ»
Адрес типографии:
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 81/12А

Издание распространяется бесплатно
ФГБОУ ВО «ИРНИТУ»,
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83