

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

12+

Том 14 N 3

2024



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ

**Прикладная химия
и биотехнология**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия
и биотехнология

Том 14 N 3 (50) 2024



ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского
технического университета



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
ПРИКЛАДНАЯ ХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ
Том 14 N 3 (50) 2024

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор:

Евстафьев С.Н.

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

Заместитель главного редактора:

Львов А.Г.

д.х.н., ведущий научный сотрудник кафедры химии и биотехнологии Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

Члены редакционной коллегии:

Боровский Г.Б.

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

Братская С.Ю.

д.х.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий 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 Гентского Университета 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)

Гао Эньцзюнь

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

Дадашев М.Н.

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

Иоелович М.Я.

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

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)

Никольшин П.А.

д.х.н., заместитель генерального директора по науке Всероссийского научно-исследовательского института по переработке нефти (г. Москва, 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 (г. 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, заведующий 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. Силхар, Индия)

Сироткин А.С.

д.т.н., директор Института пищевых производств и биотехнологии Казанского национального исследовательского технического университета (г. Казань, Россия)

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)

Цивилева О.М.

д.б.н., ведущий научный сотрудник Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» (г. Саратов, Россия)

Чхенкели В.А.

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

Шэнь Яньмин

профессор, заместитель декана факультета химической инженерии Шеньянского института химической технологии (г. Шеньян, Китай)

Ответственный секретарь:

Чеснокова А.Н.

к.х.н., доцент кафедры химии и биотехнологии Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

Журнал основан в 2011 г.

Периодичность издания – ежеквартально

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

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

Подписной индекс в ООО «Урал-Пресс» – 41903

Адрес ООО «Урал-Пресс»: 620026, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Мамина-Сибиряка, 130

Учредитель и издатель:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Иркутский национальный исследовательский технический университет»

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

Издательство:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Иркутский национальный исследовательский технический университет»

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

Адрес редакции:

Россия, 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83, ауд. Е-211

E-mail: biochem@istu.edu

**PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
APPLIED CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY
IZVESTIYA VUZOV
PRIKLADNAYA KHIMIYA I BIOTEKHNOLOGIYA
Volume 14 No. 3 (50) 2024**

EDITORIAL BOARD

Editor in Chief

Sergei N. Evstaf`ev

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

Deputy Chief Editor

Andrey G. Lvov

Dr. Sci. (Chemistry), Leading Researcher, Chemistry and Biotechnology Department, Irkutsk National Research Technical University, (Irkutsk, Russia)

Editorial council

Gennadiy B. Borovskii

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

Svetlana Yu. Bratskaya

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

Ph.D. (Chemistry), 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, Mathematics Department, Irkutsk National Research Technical University (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, Chief Researcher, Physical and Colloid Chemistry Department, Gubkin Russian State University of Oil and Gas, (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)

Pavel A. Nikulshin

Dr. Sci. (Chemistry), Deputy General Director for Science, All-Russian Research Institute for Oil Refining (Moscow, Russia)

Purevsuren Barnasan

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

Mostafa Rahimnejad

Ph.D. (Biotechnology-Chemical Engineering), Professor, Chemical Engineering Department, Babol Noshirvani University of Technology (Babol, Iran)

Vasily V. Rogozhin

Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of the Laboratory for Bioactive Substance Studies, Yakutsk State Agricultural Academy (Yakutsk, Russia)

Valentina P. Salovarova

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

Sanjib Kumar Panda

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

Alexander S. Sirotkin

Dr. Sci. (Engineering), Director of Institute of Food Production and Biotechnology, Kazan National Research Technical University (Kazan, Russia)

Boris A. Ulyanov

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

Vitaliy V. Khutoryanskiy

Cand. Sci. (Chemistry), Professor, Pharmaceutical School, University of Reading (London, Great Britain)

Olga M. Tsivileva

Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS (Saratov, Russia)

Vera A. Chkhenkeli

Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of Anatomy, Physiology and Microbiology Department, Irkutsk State Agricultural University (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), Associate Professor, Chemistry and Biotechnology Department, Irkutsk National Research Technical University (Irkutsk, Russia)

The journal was founded in 2011

The journal is issued quarterly

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

Certificate registration FS 77-62814 of 18 August, 2015

The subscription code in Ural-Press LLC: 41903

The postal address of Ural-Press LLC: 130, Mamin-Sibiriyak St., Yekaterinburg, 620026, Russian Federation

Founder and Publisher:

the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education

"Irkutsk National Research Technical University"

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

Publishing Office:

the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education

"Irkutsk National Research Technical University"

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

Editorial address:

E-211, 83, Lermontov St., Irkutsk, 664074, Russian Federation,

E-mail: biochem@istu.edu

СОДЕРЖАНИЕ

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Афонин Е.Г. Глюконатные растворы для электрохимического и химического никелирования.....	298
Кузнецова Ю.Л., Гушина К.С., Лобанова К.С., Румянцева В.О., Егорихина М.Н., Фарафонтова Е.А., Рубцова Ю.П., Семенычева Л.Л. Синтез привитых сополимеров трескового коллагена и акриламидов в присутствии системы алкилборан – <i>p</i> -хинон.....	305
Алыева А.Б., Ананичева С.А., Крапивницкая Т.О., Колякина Е.В., Глявин М.Ю., Паршин В.В., Серов Е.А. Диэлектрические параметры полимеров и мономеров винилового ряда в микроволновом диапазоне длин волн.....	322
Кунавина Е.А., Сизенцов А.Н., Брежнев А.М., Воронкова Д.С. Синтез, строение и биологическая активность моно- и бис-1-алкокси-4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-2-бутен-2-олятов натрия, цинка и магния...	330

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Стрекаловская Е.И., Сипкина Е.И. Наноструктурные материалы как опасные микрополлютанты сточных вод: источники поступления, судьба и воздействие на функциональное бактериальное сообщество активного ила.....	339
Стурова Ю.Г., Гришкова А.В., Коньшин В.В., Просеков А.Ю. Влияние физико-химических факторов на специфическую активность протеаз, применяемых в биотехнологии сыров.....	352
Гудвилович И.Н., Боровков А.Б. Оценка стабильности фикобилипротеинов оптическим методом при их хранении в водно-спиртовом растворе.....	362
Школьников М.Н., Павлов И.Н., Аверьянова Е.В., Рожнов Е.Д., Чугунова О.В. Технологические аспекты переработки бересты в компонент пищевых систем для населения Арктики и Крайнего Севера.....	371
Снегирева А.В., Мелёшкина Л.Е., Мусина О.Н. Экстракт ламинарии слоевища сушеного (<i>Laminaria thalli</i>) как средство стимулирования прорастания и переваримости овса и гречихи.....	383
Скиба Е.А., Кашеева Е.И., Золотухин В.Н., Кухленко А.А. Ферментативный гидролиз высококонцентрированных субстратов, полученных из мискантуса гигантского.....	394
Гришаева И.Н., Кротова М.Г. Биохимический состав биосубстанций из пантов марала.....	406

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Горностай Т.Г. Физико-химическая характеристика меланинов культуральной среды <i>Inocutis dryophila</i> (Berk) Flasseon & Niemela.....	416
Уколова И.В., Кондакова М.А., Боровский Г.Б. Нативная организация альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ NDA и NDB в митохондриях этиолированных проростков гороха.....	421
Сахабудинова Т.Х., Вчисло Н.В., Верочкина Е.А., Федосеева В.Г., Бурдонов А.Е., Розенцвейг И.Б. Синтез 1,3-пропанбис(дитиокарбамата) натрия и исследование его флотационных свойств.....	428

CONTENTS

CHEMICAL SCIENCES

Afonin E.G. Gluconate solutions for nickel electrodeposition and nickel electroless plating.....	298
Kuznetsova Yu.L., Gushchina K.S., Lobanova K.S., Rumyantseva V.O., Egorikhina M.N., Farafontova E.A., Rubtsova Yu.P., Semenycheva L.L. Synthesis of grafted copolymers of cod collagen and acrylamides in the presence of alkylborane – <i>p</i> -quinone system.....	305
Alyeva A.B., Ananicheva S.A., Krapivnitskaia T.O., Kolyakina E.V., Glyavin M.Yu., Parshin V.V., Serov E.A. Dielectric parameters of polymers and monomers of the vinyl series in the microwave range.....	322
Kunavina E.A., Sizentsov A.N., Brezhnev A.M., Voronkova D.S. Synthesis, structure, and biological activity of sodium, zinc, and magnesium mono- and <i>bis</i> -1-alkoxy-4-(2'-naphthyl)-1,4-dioxo-2-buten-2-olates.....	330

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Strekalovskaya E.I., Sipkina E.I. Nanostructured materials as hazardous wastewater micropollutants: Sources, behavior, and impact on functional bacterial community of activated sludge.....	339
Sturova Yu.G., Grishkova A.V., Konshin V.V., Prosekov A.Yu. Influence of physicochemical factors on the specific activity of proteases used in cheesemaking biotechnology.....	352
Gudvilovich I.N., Borovkov A.B. Storage stability of phycobiliproteins in a hydroalcoholic solution evaluated by an optical method.....	362
Shkolnikova M.N., Pavlov I.N., Averyanova E.V., Rozhnov E.D., Chugunova O.V. Technological aspects of birch bark processing into a component of food systems for the population of the Arctic and the Far North.....	371
Snegireva A.V., Meleshkina L.E., Musina O.N. Dried <i>Laminaria thalli</i> extract for stimulating germination and digestibility of oats and buckwheat.....	383
Skiba E.A., Kashcheyeva E.I., Zolotukhin V.N., Kukhlenko A.A. Enzymatic hydrolysis of highly concentrated substrates obtained from <i>Miscanthus giganteus</i>	394
Grishaeva I.N., Krotova M.G. Biochemical composition of biological substances extracted from red deer antlers.....	406

BRIEF COMMUNICATION

Gornostai T.G. Physico-chemical characteristics of melanins culture medium <i>Inocutis dryophila</i> (Berk) Flasjon & Niemela.....	416
Ukolova I.V., Kondakova M.A., Borovskii G.B. Native organization of alternative NAD(P)H-dehydrogenases NDA and NDB in mitochondria of etiolated pea sprouts.....	421
Sakhabutdinova T.Kh., Vchislo N.V., Verochkina E.A., Fedoseeva V.G., Burdonov A.E., Rozentsveig I.B. Synthesis of sodium 1,3-propanebis(dithiocarbamate) and study of its flotation properties.....	428

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Обзорная статья

УДК 669.248.7+669.248.6+661.746.44

EDN: NOXMES

DOI: 10.21285/achb.925



Глюконатные растворы для электрохимического и химического никелирования

Е.Г. Афонин

Калужский научно-исследовательский институт телемеханических устройств,
Калуга, Российская Федерация

Аннотация. Гальванические покрытия никелем широко применяются в промышленности для защитно-декоративной отделки поверхностей металлических и неметаллических материалов, для защиты от коррозии при повышенной температуре в щелочной среде и в растворах органических кислот, в качестве подслоя для получения покрытий другими металлами на сталь, для повышения твердости и износостойкости поверхности, улучшения паяемости. Данные покрытия получают из водных слабокислых, а также из слабощелочных комплексных электролитов. В настоящем обзоре проанализированы литературные данные по комплексообразованию никеля(+2) с D-глюконат-ионом $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{COO}^-$, а также рассмотрены составы и некоторые технологические характеристики комплексных D-глюконатных растворов для гальванического и химического никелирования. Например, из электролита с pH 8, содержащего 53 г/дм³ $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 44 г/дм³ D- $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7\text{Na}$, 25 г/дм³ H_3BO_3 , 53 г/дм³ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 0,5–3 г/дм³ $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, при температуре 25 °С, катодной плотности тока 2,5 А/дм² с выходом по току 96,4% получают коррозионностойкое гладкое светлое гальваническое покрытие никелем, хорошо сцепленное с медной основой. Из раствора с pH 9, содержащего 5–30 г/дм³ $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10–60 г/дм³ D- $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7\text{Na}$, 5–40 г/дм³ $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3 г/дм³ $\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, 0,5 г/дм³ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$, 0,002 г/дм³ $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, при температуре 90 °С со скоростью до 0,75 мкм/мин получают химическое покрытие сплавом Ni-P(3–18 масс.%) на меди. В обзоре также обсуждаются способы приготовления D-глюконатных электролитов никелирования с использованием D-глюконата натрия, D-глюконо-1,5-лактона, D-глюконата никеля. Одним из достоинств D-глюконатных растворов никелирования является то, что D-глюконаты нетоксичны и имеют невысокую стоимость.

Ключевые слова: комплексообразование, глюконатный электролит, гальваническое никелирование, химическое никелирование, химический состав электролита, приготовление электролита

Для цитирования: Афонин Е.Г. Глюконатные растворы для электрохимического и химического никелирования // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 298–304. DOI: 10.21285/achb.925. EDN: NOXMES.

CHEMICAL SCIENCES

Review article

Gluconate solutions for nickel electrodeposition and nickel electroless plating

Evgeniy G. Afonin

Kaluga Research Institute of Telemechanical Devices, Kaluga, Russian Federation

Abstract. Nickel electroplating has found a wide range of industrial applications as a technique for creating protective and decorative coatings of metallic and non-metallic surfaces, protecting materials against corrosion at elevated temperatures in both alkaline environments and organic acid solutions, forming a sublayer for obtaining coatings of other metals on steel, enhancing the hardness and wear resistance of surfaces, as well as for improving solderability. Such coatings can be obtained from weakly acidic aqueous and weakly alkaline complex electrolytes. In this review, we

© Афонин Е.Г., 2024

analyze the available literature on complexation of nickel(+2) with D-gluconate ion $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{COO}^-$, along with that on compositions and some technological characteristics of complex D-gluconate solutions for nickel electrodeposition and electroless plating. Thus, a corrosion-resistant smooth light-colored nickel coating, tightly adhered to a copper substrate, was obtained from an electrolyte with a pH level of 8, containing 53 g/dm³ of $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 44 g/dm³ of $\text{D-C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7\text{Na}$, 25 g/dm³ of H_3BO_3 , 53 g/dm³ of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and 0.5–3 g/dm³ of $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, at a temperature of 25 °C, a cathodic current density of 2.5 A/dm² with a current efficiency of 96.4%. An electroless Ni-P(3–18 wt%) alloy coating on copper was obtained from a solution with a pH level of 9, containing 5–30 g/dm³ of $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10–60 g/dm³ of $\text{D-C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7\text{Na}$, 5–40 g/dm³ of $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3 g/dm³ of $\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, 0.5 g/dm³ of $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$, 0.002 g/dm³ of $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, at a temperature of 90 °C and a deposition rate of up to 0.75 μm/min. The review also discusses methods for preparing D-gluconate electrolytes for nickel plating using sodium D-gluconate, D-glucono-1,5-lactone, and nickel D-gluconate. One advantage of D-gluconate nickel plating solutions consists in the absence of toxicity and low cost of D-gluconates.

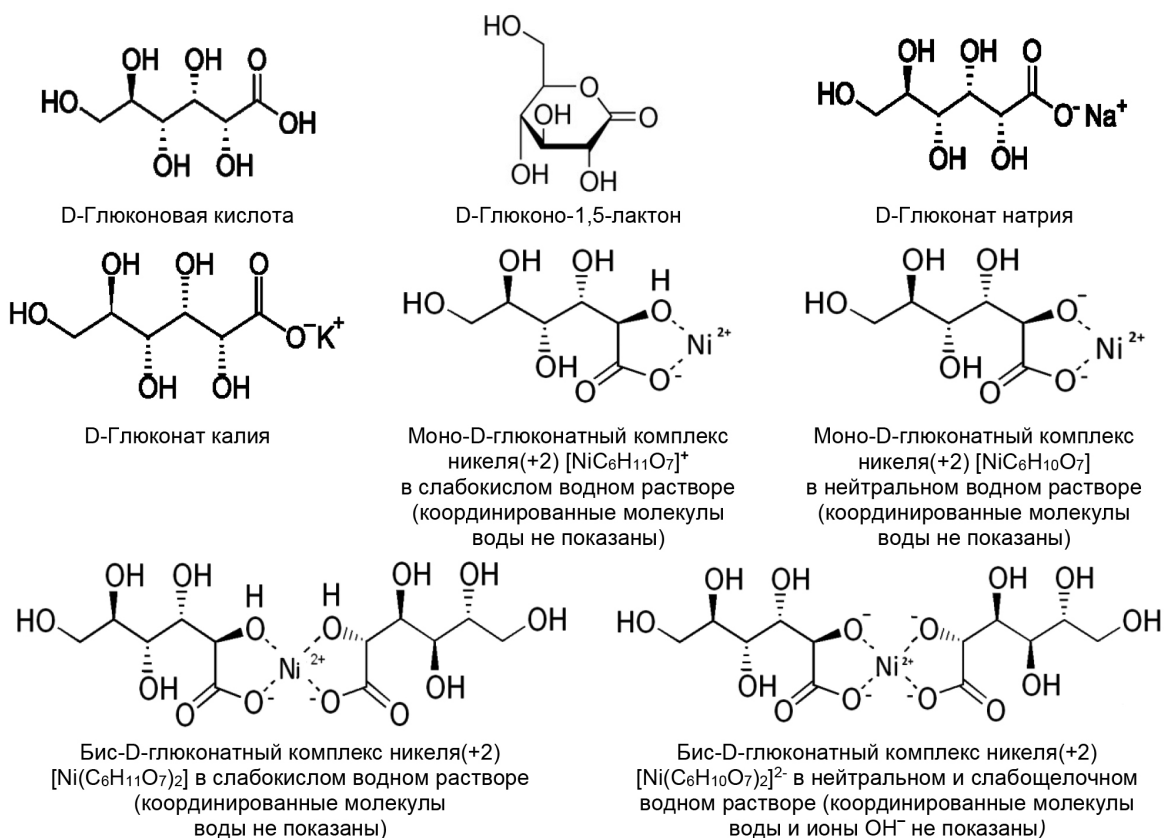
Keywords: complex formation, gluconate electrolyte, nickel electrodeposition, electroless nickel plating, electrolyte composition, electrolyte preparing method

For citation: Afonin E.G. Gluconate solutions for nickel electrodeposition and nickel electroless plating. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):298-304. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.925. EDN: NOXMES.

ВВЕДЕНИЕ

Гальванические покрытия никелем получают из водных слабокислых электролитов (хлоридных, фторидных, сульфатных, сульфатно-хлоридных, тетрафтороборатных, гексафторосиликатных, сульфаматных, перхлоратных, метансульфонатных, бензолсульфонатных, нафталинсульфонатных, сульфосалицилатных, формиатных, ацетатных и других), а также из слабощелочных комплексных электролитов (аммиачных, этилендиаминовых, триэтаноламиновых, дифосфатных, фосфонатных, оксалатных, дикарбоксилатных, лактатных, тартратных, цитратных, этилендиаминтетраацетатных и других).

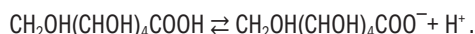
Анион D-глюконовой кислоты $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{COO}^-$ (глюконат-ион) (рисунок) образует в слабокислой, нейтральной и щелочной средах комплексы с катионами многих металлов, что используется при разработке водных комплексных электролитов, применяемых для получения покрытий металлами, в том числе и никелем. В настоящей работе рассмотрены составы D-глюконатных электролитов гальванического никелирования, созданных для промышленности, и некоторые технологические свойства электролитов и никелевых покрытий. В статье также дан обзор D-глюконатных растворов химического никелирования.



Структурные формулы D-глюконовой кислоты и D-глюконатных комплексов никеля(+2) в водном растворе
 Structural formulas of D-gluconic acid and of nickel(+2) D-gluconate complexes in aqueous solution

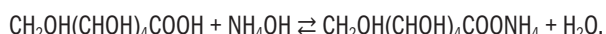
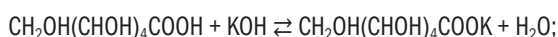
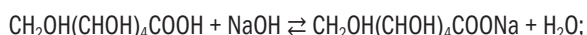
ДИССОЦИАЦИЯ D-ГЛЮКОНОВОЙ КИСЛОТЫ И КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ КАТИОНА НИКЕЛЯ(+2) С D-ГЛЮКОНАТ-ИОНОМ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

D-Глюконовая кислота ($C_6H_{12}O_7$) ведет себя в водном растворе как слабая одноосновная карбоновая кислота с показателем константы диссоциации $pK_{\text{дисс.}} = 3,48 \pm 0,06$ ($t = 25^\circ\text{C}$, $I = 1,0$ – NaClO_4) [1], $pK_{\text{дисс.}} = 3,30 \pm 0,02$ (t комнатная, $I = 0,1$ – NaClO_4) [2], $pK_{\text{дисс.}} = 3,372 \pm 0,003$ ($t = 25^\circ\text{C}$, $I = 1,0$ – NaNO_3) [3], $pK_{\text{дисс.}} = 3,709 \pm 0,004$ ($t = 25^\circ\text{C}$, бесконечное разбавление) [3]:



В водном растворе D-глюконовая кислота (см. рисунок) находится в равновесии с D-глюконо-1,5-лактоном (см. рисунок) и D-глюконо-1,4-лактоном. При pH выше 2,5 в растворе из двух изомеров содержится только D-глюконо-1,5-лактон, при pH ниже 2,0 растет доля D-глюконо-1,4-лактона, хотя D-глюконо-1,5-лактон и преобладает [2].

D-Глюконовая кислота реагирует с основаниями, образуя соли – глюконаты (см. рисунок):



В сильнощелочной среде (pH выше 12) с увеличением pH растет доля аниона $C_6H_{10}O_7^{2-}$, в котором дополнительно депротонирован гидроксил одной из спиртовых групп [2].

В водном растворе, содержащем катионы никеля(+2) и D-глюконат-ионы, в слабокислой среде (pH 4,5–7,0) образуются комплексы $[\text{NiC}_6\text{H}_{11}\text{O}_7]^+$ с $\lg K_{\text{уст.}} = 1,8$ (где $K_{\text{уст.}}$ – константа устойчивости) [4–6], а также $[\text{NiC}_6\text{H}_{10}\text{O}_7]$ [5] и $[\text{Ni}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2]$ (см. рисунок). При pH 7–9 образуются плохо растворимые в воде гидроксо-D-глюконатные соединения никеля(+2) $\text{Ni}_2(\text{OH})_3(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)$ [4], а при избытке лиганда в растворе преобладает комплекс $[\text{Ni}(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7)_2]^{2-}$ (см. рисунок) [7].

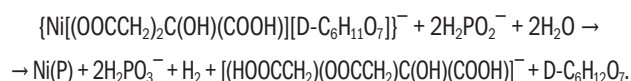
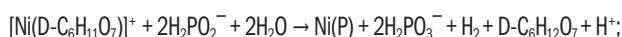
ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И СВОЙСТВА ГЛЮКОНАТНЫХ ЭЛЕКТРОЛИТОВ ГАЛЬВАНИЧЕСКОГО НИКЕЛИРОВАНИЯ

Для практического применения разработаны электролиты, состав и технологические характеристики которых представлены в табл. 1. Слабокислые электролиты никелирования (1–5)¹ содержат комплекс $[\text{Ni}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)]^+$, а также борную кислоту и соли аммония для поддержания постоянного значения pH. Нейтральный электролит (7) является билигандным глюконатно-цитратным; введение в него первичных блескообразователей по 0,5–2 г/дм³ 2-бутин-1,4-диола или 2-бутен-1,4-диола дает возможность получать никелевые покрытия с высокой отражательной способностью, а дополнение электролита блескообразователями 0,5–3 г/дм³ кумарина или 1,0–4,0 г/дм³ аллилсульфоната натрия – полублестящие покрытия никелем [8]. Электролиты (1) и (6) обеспечивают катодный выход никеля по току ~95% при высоком качестве покрытия [9, 10].

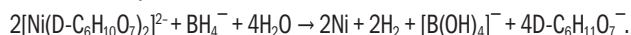
СОСТАВ И СВОЙСТВА ГЛЮКОНАТНЫХ РАСТВОРОВ ХИМИЧЕСКОГО НИКЕЛИРОВАНИЯ

Абнер Бреннер и Грейс Ридделл [14] в 1947 г. сообщили, что в присутствии глюконовой кислоты химическое осаждение никелевого покрытия под действием гипохлорита натрия протекает с незначительной скоростью. Тем не менее позднее было создано несколько D-глюконатных растворов для получения покрытий никелем и его сплавами с фосфором или бором безэлектролизным (химическим) методом [15–19] (табл. 2).

Из слабокислых (2–4) или слабощелочных (1, 4) D-глюконатных и слабокислого D-глюконатно-цитратного (5) растворов химического никелирования, в которых восстановителем является гипохлорит натрия NaH_2PO_2 , получают покрытия сплавом Ni-P:

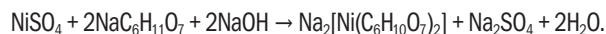
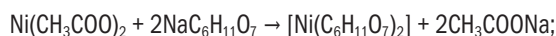
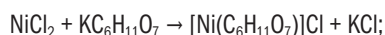


В щелочном D-глюконатном растворе (6) с тетрагидридоборатом натрия NaBH_4 и гидразином N_2H_4 в качестве восстановителей получают блестящее химическое покрытие никелем:

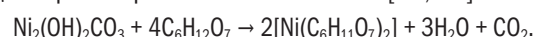


ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГЛЮКОНАТНЫХ ЭЛЕКТРОЛИТОВ НИКЕЛИРОВАНИЯ

Глюконатные электролиты никелирования обычно готовят используя растворимые в воде соли никеля ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ CAS 10101-97-0, ГОСТ 4465-74, M (для $7\text{H}_2\text{O}$) = 280,87 г/моль; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ CAS 7791-20-0, ГОСТ 4038-79, M = 237,70 г/моль; $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ CAS 13478-00-7, ГОСТ 4055-70, M = 290,80 г/моль; $\text{Ni}(\text{HCOO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ CAS 15994-70-9, ТУ 6-09-743-77, M = 184,77 г/моль; $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ CAS 6018-89-9, ТУ 6-09-3848-75, M = 248,85 г/моль) и D-глюконаты щелочных металлов ($\text{NaC}_6\text{H}_{11}\text{O}_7$ CAS 527-07-1, M = 218,14 г/моль; $\text{KC}_6\text{H}_{11}\text{O}_7$ CAS 299-27-4, M = 234,25 г/моль):



Можно взять также D-глюконовую кислоту ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ CAS 526-95-4, M (б.в.) = 196,16 г/моль), но значительно чаще применяют ее 45–50%-й водный раствор, а также D-глюконат аммония ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7\text{NH}_4$ CAS 19222-41-4, M = 213,19 г/моль), D-глюконо-1,5-лактон ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$ CAS 90-80-2, M = 178,14 г/моль). Растворением $3\text{Ni}(\text{OH})_2 \cdot 2\text{NiCO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (CAS 12244-51-8, ГОСТ 4466-78) в водном растворе D-глюконовой кислоты или D-глюконо-1,5-лактона получают водный раствор D-глюконата никеля [20, 21]:



Известен хорошо растворимый в воде кристаллогидрат D-глюконата никеля $\text{Ni}(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n = 3$ или 2 (CAS 71957-07-8) [21–23], который можно использовать для приготовления D-глюконатных электролитов

¹Здесь и далее в круглых скобках указаны номера электролитов/растворов из табл. 1, 2.

Таблица 1. Химический состав и некоторые технологические характеристики D-глюконатных электролитов гальванического никелирования

Table 1. Chemical compositions and some technological characteristics of D-gluconate electrolytes for nickel electrodeposition

№	Компоненты электролита	Концентрации компонентов, моль/дм ³	pH	t, °C	i_k , А/дм ²	η_k , %	Свойства никелевого покрытия и электролита	Источник
1	NiSO ₄ NaC ₆ H ₁₁ O ₇	0,144 0,23	4,3	40	1	~92	Блестящее покрытие никелем, отлично сцепленное с медной основой. Рассеивающая способность электролита – 7,0%	[9]
2	NiSO ₄ NiCl ₂ NaC ₆ H ₁₁ O ₇ H ₃ BO ₃	0,125 0,125 0,25 0,25	6,0	21–23	–	50–75	Покрывание никелем с гладкой или с подобной «цветной капусте» поверхностью	[11]
3	NiSO ₄ NaC ₆ H ₁₁ O ₇ H ₃ BO ₃ (NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 0,2 0,5 0,5	3,5	Комнатная	–	34–47	Плотное беспористое покрытие никелем с сетью микротрещин	[12]
4	NiCl ₂ NaC ₆ H ₁₁ O ₇ H ₃ BO ₃ NH ₄ Cl	0,1 0,2 0,5 0,5	3,5	Комнатная	–	36–55	Плотное беспористое покрытие никелем с сетью микротрещин	[12]
5	NiSO ₄ NaC ₆ H ₁₁ O ₇ H ₃ BO ₃ NH ₄ Cl	0,1 0,2 0,5 0,5	3,5	20–22	4,0	35,0	Плотное беспористое покрытие никелем с сетью микротрещин	[13]
6	NiSO ₄ NaC ₆ H ₁₁ O ₇ H ₃ BO ₃ (NH ₄) ₂ SO ₄ (C ₆ H ₅ NH ₃) ₂ SO ₄ или CO(NH ₂) ₂ или C ₆ H ₅ SO ₂ NCINa·3H ₂ O	0,2 0,2 0,4 0,4 0,002–0,0097 0,0083–0,033 0,002–0,0093	8	25	2,5	96,4	Гладкое светлое покрытие никелем, хорошо сцепленное с основой	[10]
7	NiSO ₄ NiCl ₂ NaC ₆ H ₁₁ O ₇ Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (NH ₄) ₂ SO ₄ 2-Бутин-1,4-диол	0,54 0,125 0,137 0,476 0,257 0,0058–0,023	6,8–7,2	60	4,3	–	Зеркально-блестящее покрытие никелем без трещин, хорошо сцепленное с основой из алюминия, цинка, железа, меди и их сплавов. Рассеивающая способность электролита отличная	[8]

Примечание. t – рабочая температура электролита; i_k – катодная плотность тока; η_k – катодный выход по току.

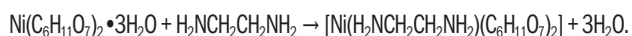
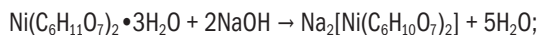
Таблица 2. Состав и некоторые технологические характеристики D-глюконатных растворов химического никелирования

Table 2. Chemical compositions and some technological characteristics of D-gluconate solutions for nickel electroless plating

№	Компоненты раствора	Концентрации компонентов, г/дм ³	pH	t, °C	d.r., мкм/мин	Химический состав покрытия	Источник
1	NiSO ₄ ·7H ₂ O	35,9	9	79–81	0,22	Сплав Ni-P	[16]
	NaC ₆ H ₁₁ O ₇	110					
	NaH ₂ PO ₂ ·H ₂ O	25					
	H ₃ BO ₃	30					
	Pb ²⁺	0,010					
2	NiSO ₄ ·7H ₂ O	35,9	5,0	79–81	–	94,5 масс.% Ni, 4,5 масс.% P, 2 масс.% Sb	[16]
	NaC ₆ H ₁₁ O ₇	60					
	NaH ₂ PO ₂ ·H ₂ O	20					
	H ₃ BO ₃	15					
	Глюконат сурьмы(+3) (в пересчете на Sb)	0,100					
3	NiSO ₄ ·7H ₂ O	35,9	5,0	79–81	–	93 масс.% Ni, 4 масс.% P, 3,3 масс.% Sb	[16]
	NaC ₆ H ₁₁ O ₇	120					
	NaH ₂ PO ₂ ·H ₂ O	20					
	H ₃ BO ₃	30					
	Глюконат сурьмы(+3) (в пересчете на Sb)	0,200					
4	NiSO ₄ ·6H ₂ O	5–30	5–10	50–100	0,11–0,75	Аморфные сплавы Ni-P с содержанием фосфора 3–8,5 или 3–18 масс.%	[17]
	NaC ₆ H ₁₁ O ₇	10–60					
	NaH ₂ PO ₂ ·H ₂ O	5–40					
	HOOCCH ₂ CH ₂ COOH	3					
	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na	0,5					
	Pb(CH ₃ COO) ₂ ·3H ₂ O	0,002					
5	NiSO ₄ ·6H ₂ O	28	5,5	85–89	0,20	Гомогенное покрытие сплавом Ni-P(13 масс.%) без трещин с хорошей адгезией к основе	[18]
	NaC ₆ H ₁₁ O ₇	20					
	NaH ₂ PO ₂ ·H ₂ O	35					
	CH ₃ COOH	1,4					
	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	44					
	Pb ²⁺	Следы					
6	Ацетат никеля	2,5	10–12,5	–	–	Однородное покрытие никелем с металлическим блеском	[19]
	NaC ₆ H ₁₁ O ₇	4,5					
	NaBH ₄	0,25					
	H ₃ BO ₃	1,25					
	N ₂ H ₄ ·H ₂ SO ₄	0,25					
	NH ₃ и NaOH	До достижения pH					

Примечание. t – рабочая температура электролита; d.r. – скорость осаждения покрытия.

никелирования, не содержащих иных анионов кроме D-глюконата:



D-Глюконовая кислота имеет очень высокую растворимость в воде (~600 г/дм³ при 25 °C), D-глюконаты щелочных металлов и аммония легко растворимы в воде, например, растворимость D-глюконата натрия (г/100 г воды) составляет 50,0 (9,3 °C), 59,9 (24,6 °C), 71,0 (38,0 °C), 80,0 (47,2 °C) [24, 25], растворимость D-глюконата аммония – 31,6 г/100 г воды при 25 °C [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

D-Глюконат-ион является лигандом, связывающим катионы никеля(+2) в термодинамически умеренно устойчивые комплексы в слабокислой, нейтральной и слабощелочной средах. Это дало возможность создать на их основе значительное число электролитов для гальва-

нического никелирования и растворов для химического никелирования.

Разработанные глюконатные электролиты позволяют получать качественные покрытия никелем на стали, меди, алюминии и некоторых других металлах с высоким выходом по току. Одним из достоинств таких электролитов является низкая токсичность и невысокая стоимость глюконатов.

Целесообразно продолжить работу по созданию новых водных электролитов для гальванического никелирования, содержащих D-глюконатные комплексы никеля(+2) в сочетании с веществами, влияющими на качество покрытия никелем, процесс растворения анода, например полилигандных электролитов никель(+2) – D-глюконат – триэтанолламин, никель(+2) – D-глюконат – аминокислота, никель(+2) – D-глюконат – диэтилентриамин, а также новых D-глюконатных растворов для химического никелирования (и покрытия сплавами никель – бор) с гидразином, гидразиндибораном, диметиламинобораном, пиридинбораном и другими подходящими восстановителями.

REFERENCES

1. Coccioli F., Vicedomini M. On the protonation of gluconate ions and the complex formation with lead(II) in acid solutions. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*. 1978;40(12):2103-2105. DOI: 10.1016/0022-1902(78)80215-2.
2. Zhang Z., Gibson P., Clark P., Tian G., Zanonato P.L., Rao L. Lactonization and protonation of gluconic acid: a thermodynamic and kinetic study by potentiometry, NMR and ESI-MS. *Journal of Solution Chemistry*. 2007;36:1187-1200. DOI: 10.1007/s10953-007-9182-x.
3. Bretti C., Cigala R.M., De Stefano C., Lando G., Sammartano S. Acid-base and thermodynamic properties of D-gluconic acid and its interaction with Sn²⁺ and Zn²⁺. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2016;61(6):2040-2051. DOI: 10.1021/acs.jced.5b00993.
4. Joyce L.G., Pickering W.F. An investigation of the nickel gluconate system. *Australian Journal of Chemistry*. 1965;18(6):783-794. DOI: 10.1071/CH9650783.
5. Panda C., Patnaik R.K. Gluconate complexes of cobalt(II) and nickel(II). *Journal of the Indian Chemical Society*. 1976;53:718-719. DOI: 10.5281/zenodo.6393036.
6. Warwick P., Evans N.D.M., Hall T., Vines S. Complexation of Ni(II) by α-isosaccharinic acid and gluconic acid from pH 7 to pH 13. *Radiochimica Acta*. 2003;91(4):233-240. DOI: 10.1524/ract.91.4.233.19971.
7. Escandar E.M., Sala L.F., Sierra M.G. Complexes of cobalt(II) and nickel(II) with D-alldonic and D-allduronic acids in aqueous solution. *Polyhedron*. 1994;13(1):143-150. DOI: 10.1016/S0277-5387(00)86650-4.
8. Baig M.L. Neutral nickel-plating process and bath therefor. US Patent, no. 3417005; 1968.
9. Abd El Meguid E.A., Abd El Rehim S.S., Moustafa E.M. The electroplating of nickel from aqueous gluconate baths. *Transactions of the IMF*. 1999;77(5):188-191. DOI: 10.1080/00202967.1999.11871280.
10. Eltoum A.M.S., Baraka A.M., Elfatih H.A. Electrodeposition and characterization of nickel from gluconate baths in presence of some additives. *Journal of American Science*. 2011;7(5):368-377.
11. Chat-Wilk K., Rudnik E., Włoch G., Osuch P. Importance of anions in electrodeposition of nickel from gluconate solutions. *Ionics*. 2021;27:4393-4408. DOI: 10.1007/s11581-021-04166-y.
12. Rudnik E., Wojnicki M., Włoch G. Effect of gluconate addition on the electrodeposition of nickel from acidic baths. *Surface & Coatings Technology*. 2012;207:375-388. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2012.07.027.
13. Rudnik E., Włoch G. The influence of sodium gluconate on nickel and manganese codeposition from acidic chloride-sulfate baths. *Ionics*. 2014;20:1747-1755. DOI: 10.1007/s11581-014-1137-9.
14. Brenner A., Riddell G. Deposition of nickel and cobalt by chemical reduction. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*. 1947;39:385-395. DOI: 10.6028/jres.039.024.
15. Gutzeit G., Talmey P., Lee W.G. Chemical nickel plating processes and bath therefor. US Patent, no. 2935425; 1960.
16. Boose C.A. Recent developments in electroless plating. *Transactions of the IMF*. 1975;53(1):49-54. DOI: 10.1080/00202967.1975.11870338.
17. Eltoum M.S.A., Elhaj A.H. Development of electroless deposition of nickel from alkaline hypophosphite baths using gluconate as complexing agent. *International Journal of Multidisciplinary Sciences and Engineering*. 2014;5(1):34-43.
18. Tangi A., Elhark M., Bachir A.B., Shrir A., Cherkaoui M., Ebntouhami M., et al. Self-catalytic bath and method for the deposition of a nickel-phosphorus alloy on a substrate. US Patent, no. 6143059; 2000.
19. Franz H., Lecoco D.E. Method for stabilizing a chemical filming composition. US Patent, no. 3893865; 1975.
20. Chester A.E., Reisinger F.F. Cadmium plating. US Patent, no. 2485565; 1949.
21. Melson G.A., Pickering W.F. A study of solid nickel gluconates. *Australian Journal of Chemistry*. 1968;21(5):1205-1212. DOI: 10.1071/CH9681205.
22. May O.E., Weisberg S.M., Herrick H.T. Some physical constants of d-gluconic acid and several of its salts. *Journal of the Washington Academy of Sciences*. 1929;19(20):443-447.

23. Escandar G.M., Peregrin J.M.C., Sierra M.G., Martino D., Santoro M., Frutos A.A., et al. Interaction of divalent metal ions with d-gluconic acid in the solid phase and aqueous solution. *Polyhedron*. 1996;15(13):2251-2261. DOI: 10.1016/0277-5387(95)00478-5.

24. Pedrosa A., Serrano M.L. Solubilities of sodium gluconate in water and in aqueous solutions of ethanol

and methanol. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2000;45(3):461-463. DOI: 10.1021/je990305x.

25. Prescott F.J., Shaw J.K., Billello J.P., Cragwall G.O. Gluconic acid and its derivatives. *Industrial & Engineering Chemistry*. 1953;45(2):338-342. DOI: 10.1021/ie50518a030.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Афонин Евгений Геннадиевич,
к.х.н., старший научный сотрудник,
Калужский научно-исследовательский
институт телемеханических устройств,
248000, г. Калуга, ул. Карла Маркса, 4,
Российская Федерация,
afonineg.chem@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0005-5457-8646>

Вклад автора

Автор выполнил анализ литературы,
на основании полученных результатов
провел обобщение, подготовил рукопись
к печати.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта
интересов.

Автор прочел и одобрил окончательный
вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 14.09.2023.
Одобрена после рецензирования 05.05.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Evgeniy G. Afonin,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
Kaluga Research Institute
of Telemechanical Devices,
4, Karl Marx St., Kaluga, 248000,
Russian Federation,
afonineg.chem@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0005-5457-8646>

Contribution of the author

The author performed the review, made
a generalization on the basis of the results
obtained and prepared the copyright
for publication.

Conflict interests

Author declares no conflict of interests regarding
the publication of this article.

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

Information about the article

The article was submitted 14.09.2023.
Approved after reviewing 05.05.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.

Научная статья
УДК 541.64:577.112.4
EDN: QJGTNQ
DOI: 10.21285/achb.938



Синтез привитых сополимеров трескового коллагена и акриламидов в присутствии системы алкилборан – п-хинон

Ю.Л. Кузнецова*✉, К.С. Гущина*, К.С. Лобанова*, В.О. Румянцева*,
М.Н. Егорихина**, Е.А. Фарафонтова**, Ю.П. Рубцова**, Л.Л. Семенычева*

*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Российская Федерация

**Приволжский исследовательский медицинский университет Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Российская Федерация

Аннотация. Была исследована привитая полимеризация акриламида и N-изопропилакриламида на коллаген в присутствии комплекса триэтилбор–гексаметилендиамин и ряда п-хинонов: бензохинона, нафтохинона, 2,5-ди-трет-бутил-п-бензохинона и дурухинона. Во всех случаях п-хиноны ведут себя как замедлители полимеризации и снижают конверсию мономера. Исключением является привитая полимеризация акриламида на коллаген в присутствии бензохинона, который проявляет себя ингибитором полимеризации. Доля синтетического фрагмента в полученных сополимерах определяется строением мономера и п-хинона. Кривые молекулярно-массового распределения содержат моды, относящиеся к непрореагировавшему коллагену, значительно отличающиеся по интенсивности от исходного коллагена. Это обусловлено образованием привитого сополимера сшитой структуры, который нельзя проанализировать методом гель-проникающей хроматографии. Разрушение сополимеров под действием ферментов контролировали методом гель-проникающей хроматографии. Ферментативный гидролиз сополимеров протекает медленнее, чем коллагена, что подтверждает образование сополимера. Через 3 часа после начала гидролиза кривые молекулярно-массового распределения содержат низкомолекулярные моды коллагена и моды низкой интенсивности, относящиеся к полиакриламидам. Морфология сополимеров отличается от морфологии коллагена и полиакриламидов. Оценка цитотоксичности – важный этап исследований сополимеров, позволяющий рассматривать их как основу материалов для регенеративной медицины. Анализ экстрактов, полученных из сополимеров при помощи культуральной среды, методом МТТ-теста показал высокий ранг токсичности. Разведение экстрактов сополимеров коллагена и N-изопропилакриламида водными растворами приводит к ее снижению. Для сополимеров коллагена и акриламида токсичность сохраняется, что обусловлено высокой токсичностью мономера. Снижение токсичности сополимеров возможно после экстракции непрореагировавшего акриламида хлороформом.

Ключевые слова: коллаген, акриламид, N-изопропилакриламид, алкилборан, п-хинон, привитой сополимер

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-23-20091.

Для цитирования: Кузнецова Ю.Л., Гущина К.С., Лобанова К.С., Румянцева В.О., Егорихина М.Н., Фарафонтова Е.А. [и др.]. Синтез привитых сополимеров трескового коллагена и акриламидов в присутствии системы алкилборан – п-хинон // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 305–322. DOI: 10.21285/achb.938. EDN: QJGTNQ.

Synthesis of grafted copolymers of cod collagen and acrylamides in the presence of alkylborane – *p*-quinone system

Yulia L. Kuznetsova*✉, Ksenya S. Gushchina*, Karina S. Lobanova*,
Victoria O. Rumyantseva*, Marfa N. Egorikhina**, Ekaterina A. Farafontova**,
Yulia P. Rubtsova**, Luydmila L. Semenycheva*

*National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod,
Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. The graft polymerization of acrylamide and *N*-isopropylacrylamide onto collagen in the presence of triethylborohexamethylenediamine complex and a number of *p*-quinones, including benzoquinone, naphthoquinone, 2,5-di-*t*-butyl-*p*-benzoquinone, and duroquinone, was studied. In all cases, *p*-quinones act as polymerization retarders, reducing monomer conversion. An exception is the graft polymerization of acrylamide onto collagen in the presence of benzoquinone, which acts as a polymerization inhibitor. The proportion of the synthetic fragment in the obtained copolymers is determined by the structure of the monomer and *p*-quinone. The molecular weight distribution curves contain modes related to unreacted collagen, which differ significantly from those of the initial collagen in terms of intensity. This is related to the formation of a grafted copolymer of cross-linked structure, which cannot be analyzed by gel permeation chromatography. The degradation of copolymers under the action of enzymes was controlled by gel permeation chromatography. Enzymatic hydrolysis of copolymers proceeds slower than that of collagen, which confirms the formation of a copolymer. Following three hours after the onset of hydrolysis, the molecular weight distribution curves contain low-molecular weight modes of collagen and low-intensity modes related to polyacrylamide. The morphology of copolymers differs from that of collagen and polyacrylamides. Cytotoxicity evaluation of copolymers is an important research stage, determining their prospects as the basis of materials for regenerative medicine. An analysis of extracts obtained from the copolymers using culture medium by MTT assay showed a high rank of their toxicity, which can be reduced by dilution of collagen and *N*-isopropylacrylamide copolymer extracts with aqueous solutions. For the copolymers of collagen and acrylamide, the toxicity is maintained due to the high toxicity of the monomer. Their toxicity can be reduced by extraction of unreacted acrylamide with chloroform.

Keywords: collagen, acrylamide, *N*-isopropylacrylamide, alkylborane, *p*-quinone, grafted copolymer

Funding. The Russian Science Foundation financially supported this work (project no. 22-23-20091).

For citation: Kuznetsova Yu.L., Gushchina K.S., Lobanova K.S., Rumyantseva V.O., Egorikhina M.N., Farafontova E.A., et al. Synthesis of grafted copolymers of cod collagen and acrylamides in the presence of alkylborane – *p*-quinone system. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):305-321. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.938. EDN: QJGTNQ.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие регенеративной медицины ставит перед химиками важную задачу – создание новых тканезамещающих материалов – скаффолдов – для сохранения, восстановления и улучшения функционирования поврежденных тканей и органов. Такие материалы должны быть биосовместимыми, биоразлагаемыми, нетоксичными, биологически активными, а также иметь определенную структуру, которая позволит клеткам расти внутри скаффолда [1, 2]. В настоящее время предложено множество скаффолдов из различных природных и синтетических полимеров. Важное место среди них занимают коллагеновые материалы [3–11]. Белковая структура коллагена имеет высокую степень пористости, гидратированности и микроволокнистую структуру, за счет которой соз-

дается достаточно обширная площадь поверхности для прикрепления клеток, что обеспечивает их миграцию и условия для поддержания жизнедеятельности [7, 8]. Коллаген обладает хорошей биосовместимостью, так как является самым распространенным белком в организмах млекопитающих. Наибольший интерес представляет морской (рыбный) коллаген [5, 12–17]. Он на 96% идентичен человеческому, поэтому тканезамещающие материалы на его основе не вызывают аллергических реакций. Морские животные не являются переносчиками заболеваний, опасных для человека. Кроме того, использование материалов на основе рыбного коллагена не противоречит религиозным представлениям. Все перечисленное делает морской коллаген незаменимым компонентом материалов

регенеративной медицины, однако он имеет низкие показатели механических свойств [18], важные в случае твердых скаффолдов, и слабую гелеобразующую способность, необходимую для получения гелеобразных материалов. Для улучшения механических свойств используются различные приемы: получение сшитых структур физическими [19, 20] и химическими [21–31] методами; синтез сополимеров, включающих коллаген и синтетические полимеры [9, 26–34], в том числе взаимопроницающих гелей [26–28, 31]. Введение синтетических фрагментов в природный полимер значительно усиливает механические свойства [18, 31, 33]. Сшитые привитые сополимеры могут быть положены в основу создания и гелеобразных материалов, в этом плане наибольший интерес представляют сополимеры коллагена с полиакриламидами [26–29], что обусловлено способностью этих сополимеров образовывать устойчивые гидрогели. Обычно их получение проводят под действием водорастворимых инициаторов – персульфатов аммония и щелочных металлов [26–31].

Другой подход для синтеза сополимеров коллагена и синтетических полимеров заключается в использовании в качестве инициатора алкилов бора. Алкилбораны в сочетании с кислородом позволяют осуществлять привитую полимеризацию широкого круга мономеров на поверхности природных [34] и синтетических [35, 36] полимеров. Данная особенность алкилборанов положена в основу создания пломбировочного материала для восстановления зубов [37] и акрилатных клеевых композиций [38–40], которые образуют прочные композиты, а разрыв под нагрузкой происходит по склеиваемому материалу. Получены привитые сополимеры коллагена [41–45] или денатурированного коллагена – желатина [46–48] с полиметилметакрилатом (ПММА) [41, 45–47], полибутилакрилатом (ПБА) [43, 44], полиакриламидом (ПАА) [42, 48] в присутствии трибутилбора (ТББ) [41, 42, 45–48] и триэтилбора (ТЭБ) [43, 44], а также системы ТББ – *p*-хинон [45, 46]. Во всех случаях образуются сшитые сополимеры, что обусловлено способностью алкилборана участвовать в стадии иницирования, передачи цепи и реиницирования реакционных цепей при радикальной полимеризации. Этот эффект усиливается в случае синтеза сополимеров желатин–ПММА [46] и коллаген–ПММА [45] при одновременном присутствии ТББ и *p*-хинона.

Целью проведенной работы являлся синтез сшитых привитых сополимеров трескового коллагена с ПАА и поли-*N*-изопропилакриламидом (ПНИПА) в присутствии комплекса ТЭБ – гексаметилендиамин (ГМДА) и ряда *p*-хинонов: *p*-бензохинона (БХ), *p*-нафтохинона (НХ), 2,5-ди-*трет*-бутил-*p*-бензохинона (2,5-ДТБХ), дурухинона (ДХ). Главные задачи исследования включали подтверждение состава и структуры сополимеров с привлечением методов физико-химического анализа, а также изучение влияния строения мономера и *p*-хинона на состав, молекулярно-массовые характеристики и цитотоксичность сополимеров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Коллаген был получен путем обработки кожи трески 3%-м раствором уксусной кислоты (1:5) в течение 18 ч по запатентованной методике [49]. Характеристики коллагена: $M_n = 244$ kDa, $M_w = 279$ kDa, $M_z = 304$ kDa, PDI = 1,14. Акриламид (АА) очищали пере-

кристаллизацией из бензола, температура плавления – 84 °С. *N*-изопропилакриламид (НИПА) (Aldrich, США), ТЭБ–ГМДА, ДХ (Aldrich, США), БХ (Aldrich, США) использовали без предварительной очистки. НХ («Реахим», Россия) очищали перекристаллизацией из петролейного эфира, 2,5-ДТБХ – перекристаллизацией из диэтилового эфира.

Привитая полимеризация. Для синтеза сополимера коллагена и АА (НИПА) в трехгорлую колбу помещали 30 мл 1%-й уксуснокислой дисперсии коллагена и нагревали на водяной бане до 60 °С в атмосфере аргона. Затем добавляли 0,05 г комплекса ТЭБ–ГМДА и выдерживали 30 мин. После этого в реакционную колбу добавляли *p*-хинон (массы представлены в табл. 1) и 0,3 г АА (НИПА). Реакционную смесь выдерживали еще 3 ч при 60 °С. Все операции проводили в токе аргона и при постоянном перемешивании.

Таблица 1. Массы *p*-хинонов, использованные в синтезе сополимеров коллагена и акриламида (*N*-изопропилакриламида)

Table 1. Masses of *p*-quinones used in the synthesis of collagen and acrylamide (*N*-isopropylacrylamide) copolymers

<i>p</i> -Хинон	Масса, г
<i>p</i> -Бензохинон	0,00110
<i>p</i> -Нафтохинон	0,00165
2,5-Ди- <i>трет</i> -бутил- <i>p</i> -бензохинон	0,00230
Дурухинон	0,00170

Определение остаточного мономера, расчет конверсии и эффективности прививки. Непрореагировавший мономер определяли бромированием по методу Кноппа [42]. При вычислении содержания мономера учитывается количество брома, идущего на титрование. В мерную колбу помещали 1 мл дисперсии из синтеза и 100 мл дистиллированной воды. После этого добавляли 25 мл бромид-броматного раствора $KBr + KBrO_3$ и 10 мл 10%-го раствора HCl . Перемешивали и оставляли в темном месте на 2,5 ч. После этого прибавляли 15 мл 10%-го раствора KI и оттитровывали выделившийся йод 0,1 н раствором тиосульфата натрия $Na_2S_2O_3$. Аналогично был проведен контрольный опыт с дистиллированной водой.

Содержание мономера X , %, вычисляли следующим образом:

$$X = (a - b) \times m / 200 \times m,$$

где a и b – объемы 0,1 н раствора $Na_2S_2O_3$, израсходованного на титрование контрольной и анализируемой проб соответственно, мл; M – молекулярная масса АА (НИПА), г/моль; m – навеска образца сополимера, г.

На основании полученного значения рассчитывали массы непрореагировавшего мономера $m_{ост.м.}$, г, и мономера, вошедшего в состав сополимера $m_{синт.ч.}$, г, а также конверсию мономера P , %, и эффективность прививки $ЭП$, %, по формулам:

$$\begin{aligned} m_{ост.м.} &= X \times m_{р.с.} / 100; \\ m_{синт.ч.} &= m_{исх.м.} - m_{ост.м.}; \\ P &= m_{синт.ч.} \times 100 / m_{исх.м.}; \\ ЭП &= m_{синт.ч.} \times 100 / (m_{синт.ч.} + m_{кол.}), \end{aligned}$$

где X – содержание остаточного мономера в реакционной смеси, %; $m_{р.с.}$ – масса реакционной смеси, г; $m_{ост.м.}$ – масса непрореагировавшего мономера, г;

$m_{\text{исх.м.}}$ – начальная масса мономера, использованного в синтезе, г; $m_{\text{синт.ч.}}$ – масса мономера, вошедшего в состав сополимера, г; ЭП – эффективность прививки, %; $m_{\text{кол.}}$ – масса коллагена, г.

Гель-проникающая хроматография. Определение молекулярно-массовых характеристик уксуснокислых дисперсий сополимеров, отобранных из реакционной колбы после синтеза, а также водных дисперсий продуктов ферментативного гидролиза сополимеров проводили методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) с применением высокоэффективного жидкостного хроматографа CTO20A/20AC (Shimadzu, Япония) с программным модулем LC-Solutions-GPC. Подготовку дисперсий для анализа осуществляли путем фильтрации через насадочные полиамидные мембраны с диаметром пор 0,45 мкм. Разделение проводили с применением колонки Tosoh Bioscience TSKgel G3000SWxl с диаметром пор 5 мкм. В качестве детектора использовали низкотемпературный светорассеивающий детектор ELSD-LT II. Элюентом служил 0,5 М раствор уксусной кислоты. Скорость потока 0,8 мл/мин, $T = 30^\circ\text{C}$. Для калибровки применяли узкодисперсные образцы декстрана с диапазоном молекулярных масс 1–410 kDa (Fluca, Германия).

Проведение ферментативного гидролиза. Ферментативный гидролиз сополимеров проводили с использованием коллагеназы и панкреатина (Hubei Maxpharm Industries Co, Китай) с протеолитической активностью 2 ЕД/мг.

Для гидролиза коллагеназой сополимеры предварительно высушивали. Затем к образцу добавляли фермент (4 масс.% сополимера) и дистиллированную воду (10 мл на 0,1 г сополимера). Смесь выдерживали в течение суток. Для гидролиза панкреатином к раствору добавляли 1 м NaOH для нейтрализации кислоты, а затем доводили до требуемого объема дистиллированной водой. Гидролиз проводили путем добавления фермента к полученной смеси при массовом соотношении сополимера и фермента $10^3:1$. Пробы (по 1 мл) отбирали через равные промежутки времени (1, 10, 30, 60 мин и 3 дня) после добавления фермента. Чтобы прервать гидролиз, к образцам добавляли 1 мл 4%-го раствора уксусной кислоты.

Смеси, полученные в результате каждого гидролиза, отфильтровывали. Оставшийся полимер концентрировали и анализировали методом ГПХ.

Растровая электронная микроскопия. Для исследования сополимеров методом растровой электронной микроскопии получали губки путем лиофильного высушивания дисперсии сополимеров после синтеза. Изображение поверхности губок коллагена и сополимеров с нанометровым разрешением получали с помощью растрового электронного микроскопа марки JEOL JSM-IT300LV в режиме низкого вакуума с разрешением 4,0 нм при ускоряющем напряжении 30 кВ и при увеличении от 5 до 2000 крат в пересчете на размер отпечатка 10×12 см.

Оценка цитотоксичности с помощью МТТ-теста. Для исследования образцов были использованы дермальные фибробласты человека (ДФЧ) 4–6 пассажа. Использовалась активная, морфологически однородная культура, хорошо адгезирующая на пластик. Иммунофенотип клеток культуры соответствовал иммунофенотипу клеток

мезенхимального ряда, жизнеспособность культуры составляла более 97%. ДФЧ с плотностью 10000 на 1 см^2 засеивали в лунки плоскодонного 96-луночного планшета в ростовой среде DMEM/F12 с антибиотиками (пенициллин – 100 ед/мл; стрептомицин – 100 мкг/мл) и 10%-й инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки. Далее клетки культивировали в стандартных условиях в течение суток. Через 24 ч во всех лунках фиксировали равномерный рост типичных фибробластоподобных клеток в виде субконфлюэнтного монослоя. После 24 ч культивирования ростовую среду над клетками заменяли исследуемыми растворами.

МТТ-тест – это колориметрический метод, основанный на реакции восстановления тетразолиевого красителя бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиума в нерастворимый формазан. Измерение концентрации формазана, отраженной в оптической плотности, проводили с использованием планшетного ридера Sunrise (Австрия) при длине волны 540 нм.

Исследуемые образцы в виде пленок, доведенных в вакуумном шкафу до постоянной массы, помещали в подготовленную ростовую среду (DMEM/F12 с растворенными антибиотиками и 2% телячьей эмбриональной сыворотки). Образцы, помещенные в ростовую среду, помещали в CO_2 -инкубатор на 24 ч при стандартных условиях (температура – 37°C , концентрация CO_2 – 5%). После 24 ч инкубации от исследуемых образцов отбирали экстракт и готовили серию разведений экстракта с ростовой средой в соотношении 1:1, 1:2, 1:4 и 1:8.

К культуре ДФЧ, посеянных в 96-луночный планшет, добавляли различные концентрации экстракта. Каждую концентрацию выполняли в 8 лунках. Планшет с образцами помещали в CO_2 -инкубатор на 72 ч.

Через 72 ч в каждую лунку добавляли раствор МТТ (20 мкл), далее клетки инкубировали с МТТ в течение 3 ч в условиях CO_2 -инкубатора. Раствор МТТ готовили в концентрации 5 мг/мл в фосфатном буферном растворе. Через 3 ч инкубации супернатант отбирали, а затем замещали на равный объем раствора диметилсульфоксида и регистрировали оптическую плотность при 540 нм на планшетном ридере.

Относительную интенсивность роста ОИР, %, определяли по следующей формуле:

$$\text{ОИР} = (\text{средняя ОП в тестовой культуре} / \text{средняя ОП в контроле}) \times 100,$$

где ОП – оптическая плотность.

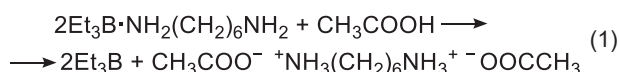
Сравнивали относительную интенсивность роста опытных серий с относительной интенсивностью роста контроля, принимая ее за 100%.

Степень выраженности цитотоксичности ранжировали:

- относительная интенсивность роста 100% – 0 ранг;
- относительная интенсивность роста 99–75% – 1 ранг, отсутствие токсичности;
- относительная интенсивность роста 74–50% – 2 ранг, легкая степень токсичности;
- относительная интенсивность роста 49–25% – 3 ранг, средняя степень токсичности;
- относительная интенсивность роста 24–0% – 4 ранг, высокая степень токсичности [49].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Привитая полимеризация метилметакрилата на пищевой желатин [46] и морской коллаген [45] в присутствии системы ТББ – *p*-хинон приводит к образованию привитых сополимеров шитой структуры. Сополимеры коллагена и ПАА синтезировали по методике, предложенной в работах [45, 46]. Поскольку триалкилбораны самопроизвольно воспламеняются на воздухе, использованный в работах [45, 46] ТББ для удобства был заменен устойчивым на воздухе комплексом ТЭБ–ГМДА. Высвобождение ТЭБ из комплекса происходит за счет взаимодействия ГМДА с уксусной кислотой, присутствующей в дисперсии коллагена (схема 1).



Для синтеза использовали предложенные ранее [45] для сополимеров коллаген–ПММА *p*-хиноны: БХ, НХ, 2,5-ДТБХ и ДХ, различающиеся по строению и реакционной способности [50]. Температура синтеза составляла 60 °С, так как было показано, что, несмотря на частичную денатурацию коллагена при этой температуре, образующиеся сополимеры коллаген–ПММА [41, 45] и коллаген–ПАА [42] обладают лучшими физико-механическими свойствами и наименьшей цитотоксичностью.

Процесс денатурации при 60 °С проходит медленно, особенно в том случае, когда параллельно идет функционализация белка [51].

Механизм прививки синтетических полимеров на природные предполагает предварительное борирование по гидроксильным группам коллагена (схема 2), а затем проведение полимеризации по механизму обратимого ингибирования (схемы 3–5).

По окончании синтеза была получена прозрачная вязкая дисперсия, которую далее анализировали на содержание остаточного мономера (табл. 2).

Как видно из табл. 2, введение любого *p*-хинона приводит к снижению конверсии мономера (или отсутствию полимеризации в случае АА и БХ), то есть использованные *p*-хиноны замедляют процесс полимеризации. Конверсия мономера зависит от строения мономера и *p*-хинона. Так, для НИПА во всех случаях, кроме 2,5-ДТБХ, выход полимерного продукта выше, чем для АА. При сополимеризации АА количество непрореагировавшего мономера тем выше, чем сильнее замедляющее действие *p*-хинона [50]. БХ полностью ингибирует процесс, конверсия мономера равна нулю, сополимер не образуется. Близкая закономерность наблюдается в случае НИПА, однако сополимер образуется во всех случаях, а 2,5-ДТБХ проявляет замедляющее действие, соизмеримое с БХ. Полимеризация

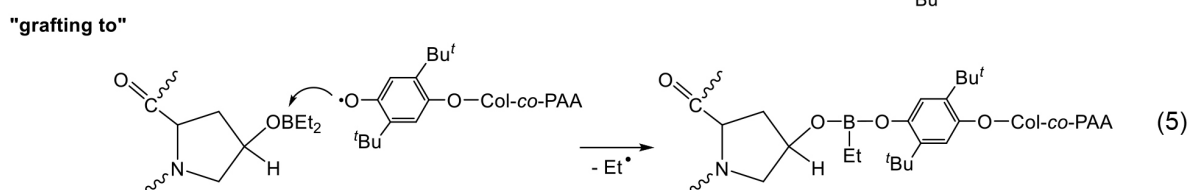
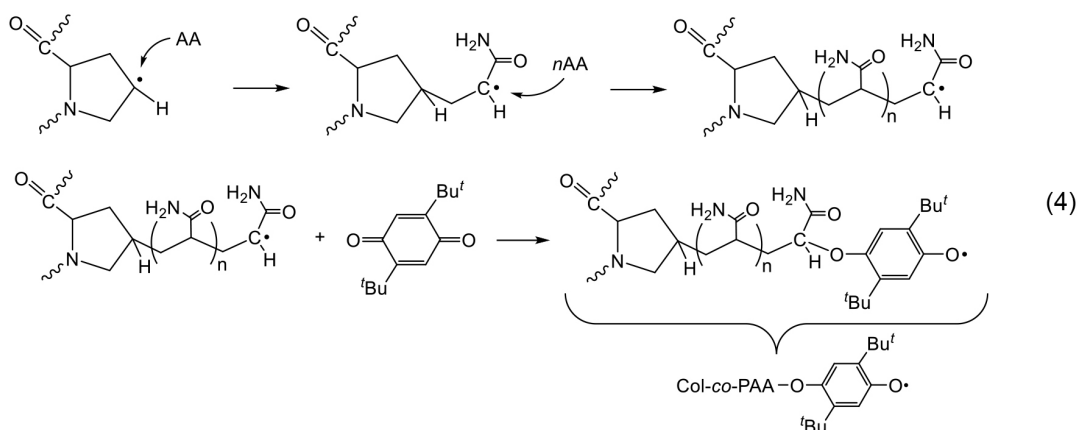
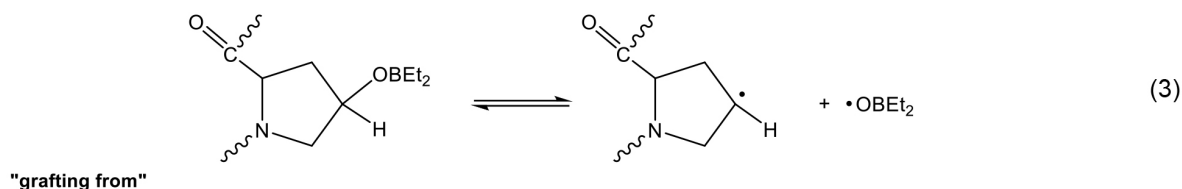
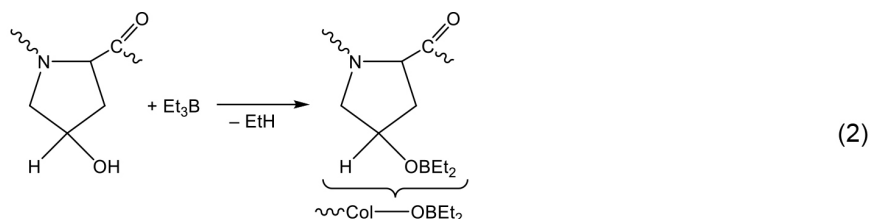


Таблица 2. Содержание остаточного мономера и доля привитого полимера в сополимере

Table 2. Residual monomer content and grafted polymer proportion in the copolymer

Мономер	Хинон	Масса непрореагировавшего мономера, г	Конверсия, %	Эффективность прививки, %
Акриламид	–	0,1619	46,0	31,5
	<i>p</i> -Бензохинон	0,3299	0,0	0,0
	<i>p</i> -Нафтохинон	0,2940	2,0	2,0
	2,5-Ди- <i>tert</i> -бутил- <i>p</i> -бензохинон	0,2136	29,0	22,4
	Дурохинон	0,2362	21,0	17,5
<i>N</i> -Изопропилакриламид	–	0,0147	95,0	48,7
	<i>p</i> -Бензохинон	0,2707	9,8	8,9
	<i>p</i> -Нафтохинон	0,2436	18,8	15,8
	2,5-Ди- <i>tert</i> -бутил- <i>p</i> -бензохинон	0,2765	7,8	7,3
	Дурохинон	0,1786	40,5	28,8

Примечание. Исходные массы: collagen – 0,3 г; мономер – 0,3 г; триэтилбор-гексаметилендиамин – 0,05 г. Концентрация *p*-хинона – 0,25 мол.% относительно мономера.

акриловых мономеров в присутствии *p*-хинонов осуществляется по двум механизмам: обычной радикальной и контролируемой радикальной полимеризациям [52]. Алкилборан нивелирует ингибирующее действие *p*-хинона [53], так как арилоксильный радикал, образующийся при взаимодействии *p*-хинона с радикалом роста, с высокой константой вступает в радикальное замещение на атоме бора (см. схему 5). Продукт данной реакции способен обратимо гомолитически диссоциировать, высвобождая радикал роста и стабильный радикал. Сочетание двух механизмов при полимеризации АА, конкурирующих и дополняющих друг друга, не позволяет точно оценить влияние *p*-хинонов на выход сополимера.

Кривые молекулярно-массового распределения (ММР) сополимеров коллагена и АА (рис. 1, кривые 2–6), а

также коллагена и НИПА (рис. 2, кривые 2–6) аналогичны кривой ММР коллагена (рис. 1 и 2, кривая 1). Мы полагаем, что часть сополимера имеет сшитую структуру (см. схемы 3, 4) и остается на фильтре при подготовке пробы для анализа методом ГПХ. Интенсивность высокомолекулярной моды на кривых ММР сополимеров значительно ниже, чем для исходного коллагена (см. рис. 1 и 2, кривую 1). Высокомолекулярная мода (см. рис. 1 и 2, кривые 2–6) относится к непрореагировавшему коллагену, а низкомолекулярная соответствует фракции в исходном полимере, не претерпевающей изменения при гидролизе коллагена [41, 54] или его модификации [41, 42, 45]. Следует отметить, что высокомолекулярный продукт, полученный в присутствии АА и БХ, не является сополимером, так как конверсия мономера равна нулю.

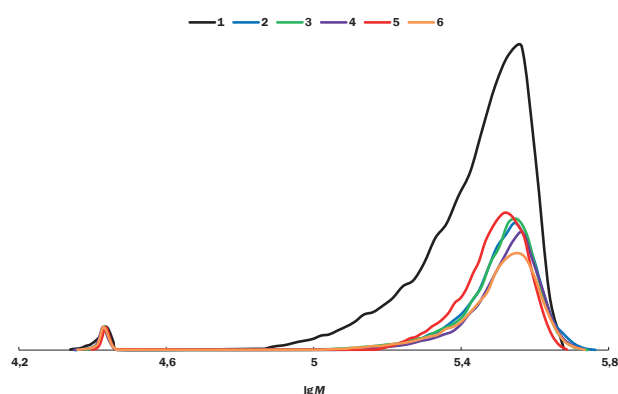


Рис. 1. Кривые молекулярно-массового распределения сополимеров коллагена и акриламида, синтезированных в присутствии комплекса триэтилбор-гексаметилендиамин и *p*-хинона: 1 – коллаген; 2 – отсутствие хинона; 3 – *p*-бензохинон; 4 – *p*-нафтохинон; 5 – 2,5-ди-*tert*-бутил-*p*-бензохинон; 6 – дурухинон

Fig. 1. Molecular mass distribution curves of collagen and acrylamide copolymers synthesized in the presence of triethylbor-hexamethylenediamine complex and *p*-quinone: 1 – collagen; 2 – absence of quinone; 3 – *p*-benzoquinone; 4 – *p*-naphthoquinone; 5 – 2,5-di-*tert*-butyl-*p*-benzoquinone; 6 – duroquinone

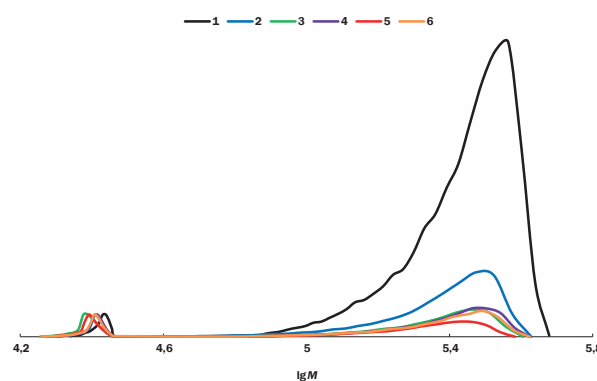


Рис. 2. Кривые молекулярно-массового распределения сополимеров коллагена и *N*-изопропилакриламида, синтезированных в присутствии комплекса триэтилбор-гексаметилендиамин и *p*-хинона: 1 – коллаген; 2 – отсутствие хинона; 3 – *p*-бензохинон; 4 – *p*-нафтохинон; 5 – 2,5-ди-*tert*-бутил-*p*-бензохинон; 6 – дурухинон

Fig. 2. Molecular mass distribution curves of collagen and *N*-isopropylacrylamide copolymers synthesized in the presence of triethylbor-hexamethylenediamine complex and *p*-quinone: 1 – collagen; 2 – absence of quinone; 3 – *p*-benzoquinone; 4 – *p*-naphthoquinone; 5 – 2,5-di-*tert*-butyl-*p*-benzoquinone; 6 – duroquinone

Снижение интенсивности высокомолекулярной моды коллагена обусловлено образованием сшитой структуры под действием системы ТЭБ–ГМДА – БХ, которая осуществляется по схемам, аналогичным схемам 2–5. Разница заключается в том, что БХ взаимодействует с радикальным центром на поверхности коллагена, а не с привитым полиакриламидным радикалом (схема 4).

Предположение об образовании сшитой структуры подтверждают последующие эксперименты. Был проведен ферментативный гидролиз образцов, в результате которого под действием фермента разрушаются пептидные связи коллагена, а цепи синтетического полимера остаются нетронутыми. Анализ гидролизатов сополимеров становится возможным, так как разрушается сшитая структура сополимера. В отобранных в процессе гидролиза пробах водного раствора сополимера анализ ГПХ показывает, что высокомолекулярная мода на кривой ММР постепенно исчезает (рис. 3, 4), остаётся мода, отвечающая низкомолекулярной фракции коллагена, которая не подвергается гидролизу со значениями молекулярной массы ~25 кДа и соответствует продуктам ферментативного гидролиза рыбного коллагена в ранее проведенных экспериментах [41, 54]. Изменения площадей под кривыми ММР исходных сополимеров и их гидролизатов представлены на рис. 5. Если сравнивать полученные результаты гидролиза сополимера с таковыми для коллагена [54], то очевидно заметное уменьшение скорости гидролиза сополимеров в сравнении с коллагеном. И даже через 3 дня сохраняются моды низкой интенсивности, которые можно отнести к не подвергшимся гидролизу ПАА (см. рис. 3, кривую 6) или ПНИПА (см. рис. 4, кривую 6). Хорошо известно, что

протеолитические ферменты гидролизуют связи белков, образованные аргинином и лизином [55]. Привитые к макромолекуле коллагена синтетические фрагменты, видимо, не препятствуют гидролизу пептидных макромолекул по тем же связям. Тем не менее стерические затруднения, связанные с прививкой синтетических фрагментов на коллаген, замедляют этот процесс гидролиза. Подобное изменение скорости гидролиза наблюдалось ранее при ферментативном разрушении привитого сополимера ММА–рыбный коллаген [45]. Молекулярная масса ПНИПА ниже, чем молекулярная масса ПАА, а при соизмеримых значениях конверсии двух мономеров число привитых полимерных цепей ПНИПА больше, чем ПАА. В связи с этим в случае ПАА остается больше непрореагировавшего коллагена (см. рис. 1, 2).

Морфология сополимеров коллагена и АА и коллагена и НИПА (рис. 6, *b* и 7, *b*) отличается от морфологии коллагена (рис. 6, *a* и 7, *a*), а также от морфологии входящих в состав ПАА (рис. 6, *c*) и ПНИПА (рис. 7, *c*). Свойство ПАА и ПНИПА поглощать и удерживать воду передается сополимерам, в состав которых они входят. В процессе лиофильной сушки из-за медленного удаления воды происходит «слипание» фрагментов сополимера в чешуйки разного размера, что приводит к визуальному уплотнению продукта на микрофотографии (см. рис. 6, *b* и 7, *b*).

Основным возможным способом применения полученных сополимеров является создание материалов для регенеративной медицины. В связи с этим необходима оценка цитотоксичности полученных образцов. Была исследована токсичность сополимеров коллагена с АА и коллагена с НИПА в присутствии 2,5-ДТБХ.

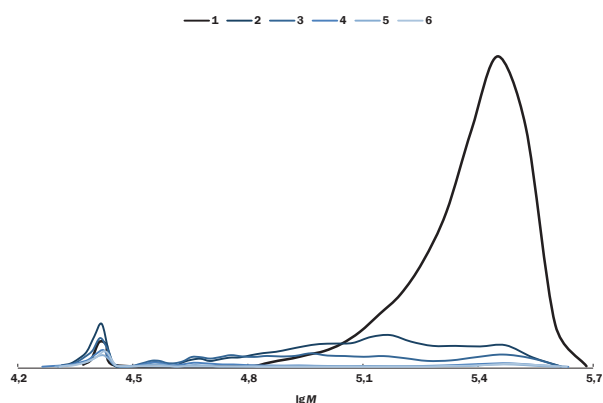


Рис. 3. Кривые молекулярно-массового распределения продуктов ферментативного гидролиза панкреатином сополимеров коллагена и акриламида, полученных в присутствии иницирующей системы триэтилбор–гексаметилендиамин – 2,5-ди-трет-бутил-*p*-бензохинон: 1 – исходный; 2 – 1 мин; 3 – 10 мин; 4 – 30 мин; 5 – 60 мин; 6 – 3 дня

Fig. 3. Molecular weight distribution curves of the products of enzymatic hydrolysis of collagen and acrylamide copolymers by pancreatin obtained in the presence of the initiating system triethylbor–hexamethylenediamine – 2,5-di-*tret*-butyl-*p*-benzoquinone: 1 – initial; 2 – 1 min; 3 – 10 min; 4 – 30 min; 5 – 60 min; 6 – 3 days

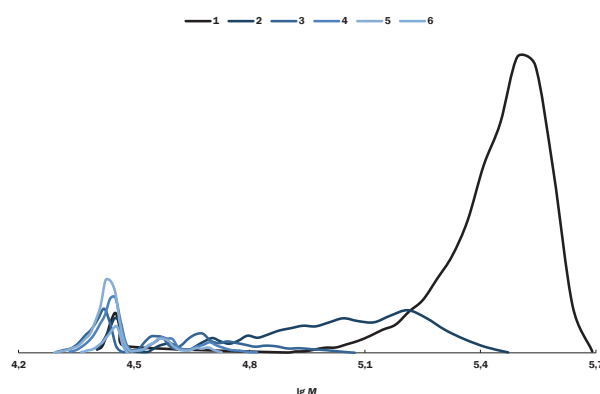


Рис. 4. Кривые молекулярно-массового распределения продуктов ферментативного гидролиза панкреатином сополимеров коллагена и *N*-изопропилакриламида, полученных в присутствии иницирующей системы триэтилбор–гексаметилендиамин – 2,5-ди-трет-бутил-*p*-бензохинон: 1 – исходный; 2 – 1 мин; 3 – 10 мин; 4 – 30 мин; 5 – 60 мин; 6 – 3 дня

Fig. 4. Molecular weight distribution curves of the products of enzymatic hydrolysis of collagen and *N*-isopropylacrylamide copolymers by pancreatin obtained in the presence of the initiating system triethylbor–hexamethylenediamine – 2,5-di-*tret*-butyl-*p*-benzoquinone: 1 – initial; 2 – 1 min; 3 – 10 min; 4 – 30 min; 5 – 60 min; 6 – 3 days

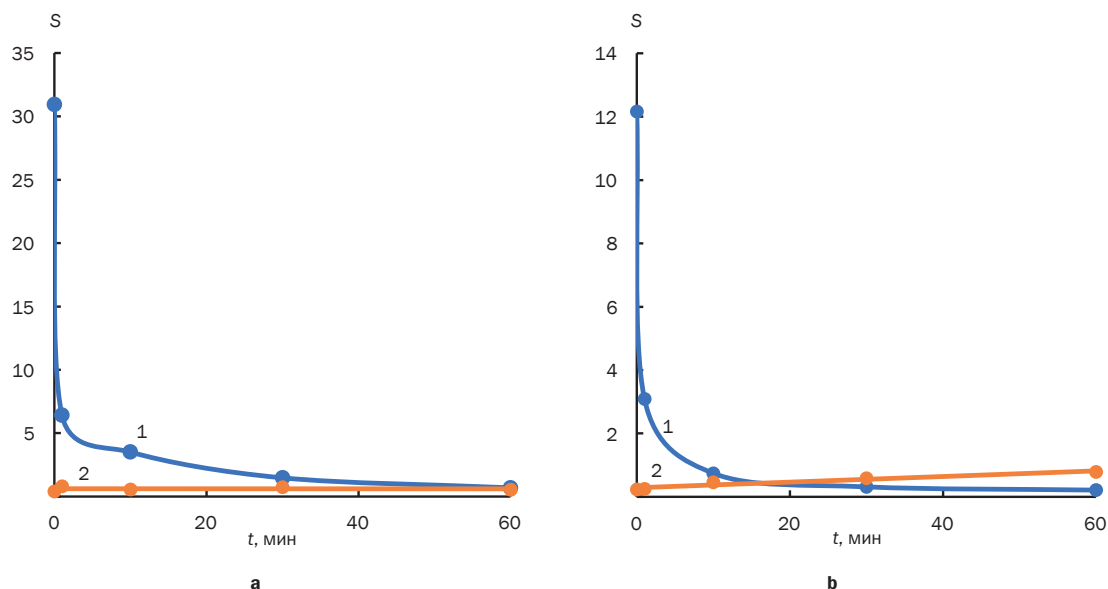


Рис. 5. Площади, ограниченные кривыми молекулярно-массового распределения, для гидролизатов сополимеров collagen–полиакриламид (а) и collagen–поли-*N*-изопропилакриламид (b) с молекулярной массой 250–300 кДа (1) и 25 кДа (2)

Fig. 5. Areas bounded by molecular mass distribution curves for hydrolysates of collagen–polyacrylamide (a) and collagen–poly-*N*-isopropylacrylamide (b) copolymers with molecular weight of 250–300 kDa (1) and 25 kDa (2)

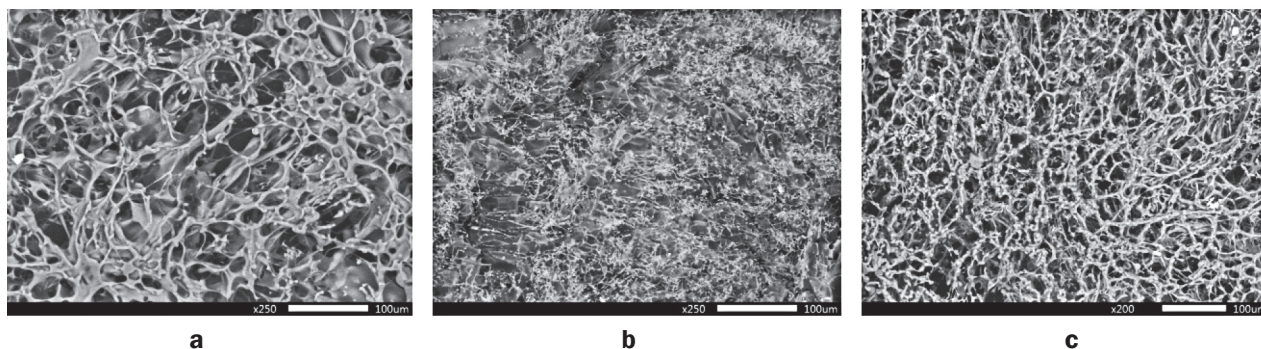


Рис. 6. Полученные методом растровой электронной микроскопии изображения морфологии лиофильно высушенных образцов коллагена (а), сополимера collagen–полиакриламид, синтезированного в присутствии системы триэтилбор–гексаметилендиамин – 2,5-ди-*трет*-бутил-*p*-бензохинон (b), полиакриламида (с)

Fig. 6. Scanning electron microscopy images of morphology of lyophilized collagen samples (a); collagen–polyacrylamide copolymer synthesized in the presence of the system triethylbor–hexamethylenediamine – 2,5-di-*трет*-butyl-*p*-benzoquinone (b), and polyacrylamide (c)

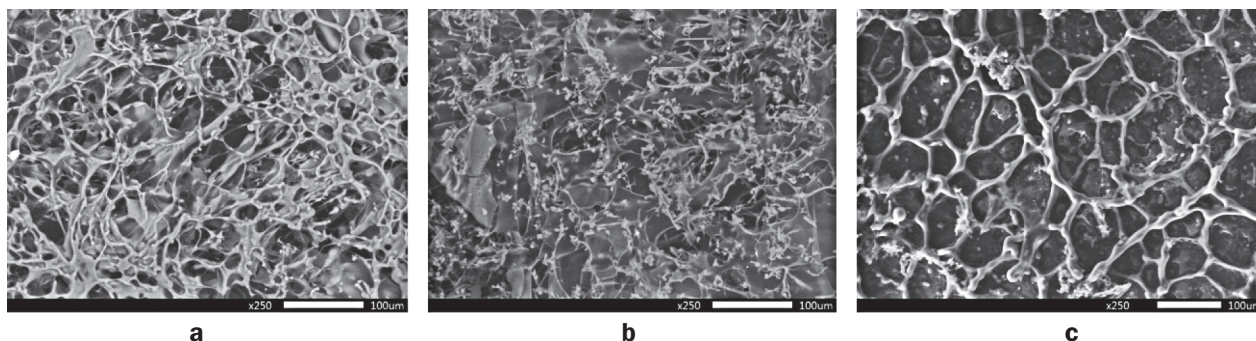


Рис. 7. Полученные методом растровой электронной микроскопии изображения морфологии лиофильно высушенных образцов коллагена (а), сополимера collagen–поли-*N*-изопропилакриламид, синтезированного в присутствии системы триэтилбор–гексаметилендиамин – 2,5-ди-*трет*-бутил-*p*-бензохинон (b), поли-*N*-изопропилакриламида (с)

Fig. 7. Scanning electron microscopy images of morphology of lyophilized collagen samples (a), collagen–poly-*N*-isopropylacrylamide copolymer synthesized in the presence of the system triethylbor–hexamethylenediamine – 2,5-di-*трет*-butyl-*p*-benzoquinone (b), and poly-*N*-isopropylacrylamide (c)

Экстракт и разведения 1:1, 1:2 и 1:4 образца сополимера коллагена и ПАА соответствуют 4 рангу цитотоксичности, что говорит о его высокой токсичности (рис. 8). Микроскопическая картина соответствует (рис. 9). Все клетки в данных разведениях ошарены. При разведении 1:8 ранг цитотоксичности снижается до 3-го (рис. 8). Помимо множества ошаренных клеток, встречаются также единичные распластанные ДФЧ (см. рис. 9, b). Однако эти клетки также токсированы. Часть образца остается нерастворенной, предположительно из-за сшитой структуры. Высокую токсичность образца мы связываем с наличием непрореагировавшего АА (см. табл. 2). Для использования таких продуктов требуется избавиться от мономера, что легко достигается с помощью экстракции хлороформом в аппарате Сокслета [48] и приводит к снижению токсичности [42].

Экстракт сополимера коллагена и ПНИПА соответствует 4 рангу цитотоксичности (рис. 10). Все клетки токсированы. В поле зрения много фрагментов образца разных размеров. При дальнейших разведениях степень цитотоксичности постепенно снижается. Разведение 1:1 демонстрирует 2 ранг, разведения 1:2 и 1:8 – 1 ранг. Фрагменты образца «слипаются» в подобия кластеров. Разведение 1:4 соответствует 0 рангу цитотоксичности (рис. 10, 11).

Таким образом, экстракты обоих сополимеров коллагена проявляли высокую степень цитотоксичности. Экстракт сополимера коллагена и ПАА сохранял высокую степень цитотоксичности при всех исследуемых разведениях, а цитотоксичность сополимера коллагена и ПНИПА при разведении нивелировалась. Такие сильные различия цитотоксического эффекта, вероятнее всего, вызваны различием в строении мономеров.

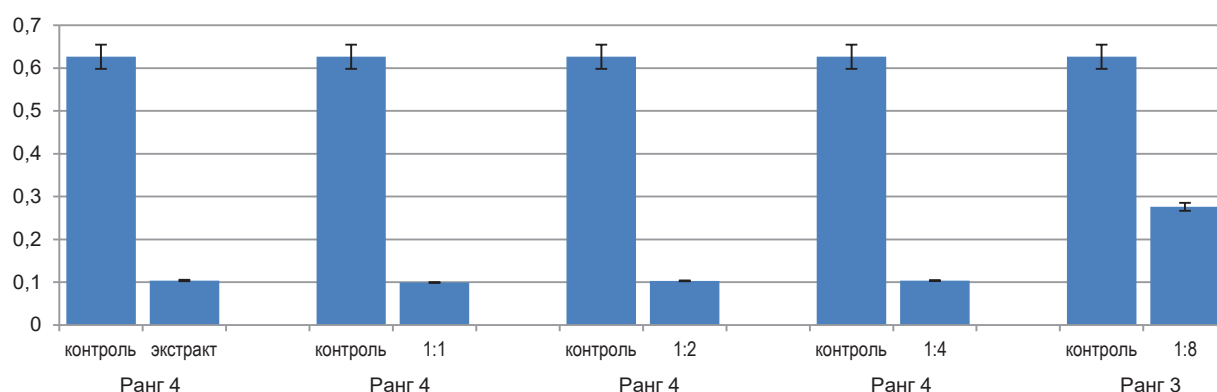


Рис. 8. Оптическая плотность экстракта, полученного из сополимера коллаген–полиакриламид, синтезированного в присутствии системы триэтилбор–гексаметилендиамин – 2,5-ди-трет-бутил-п-бензохинон, и его разведений в соотношении с контролем (MTT-тест)

Fig. 8. Optical density of the extract obtained from the collagen–polyacrylamide copolymer synthesized in the presence of the system triethylbor–hexamethylenediamine – 2,5-di-*tret*-butyl-*p*-benzoquinone and its dilutions in relation to the control (MTT assay)

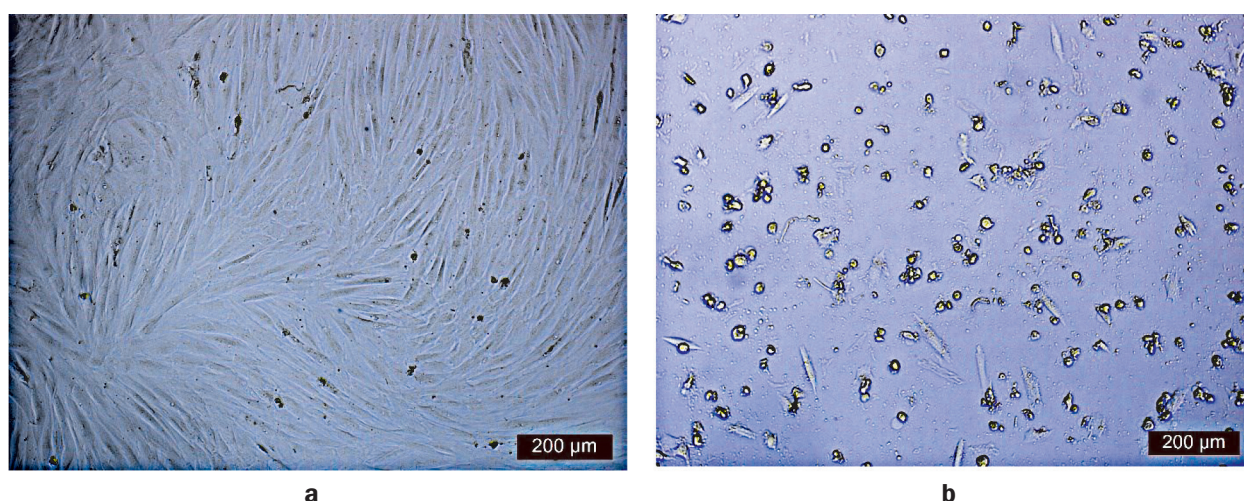


Рис. 9. Репрезентативные микрофотоснимки: а – контроль, среда без сополимера; б – с экстрактом сополимера коллаген–полиакриламид, синтезированного в присутствии системы триэтилбор–гексаметилендиамин – 2,5-ди-трет-бутил-п-бензохинон, разведение экстракта 1:8

Fig. 9. Representative micrographs: a – control, medium without copolymer; b – with an extract of the collagen–polyacrylamide copolymer synthesized in the presence of the system triethylbor–hexamethylenediamine – 2,5-di-*tret*-butyl-*p*-benzoquinone, dilution of the extract 1:8

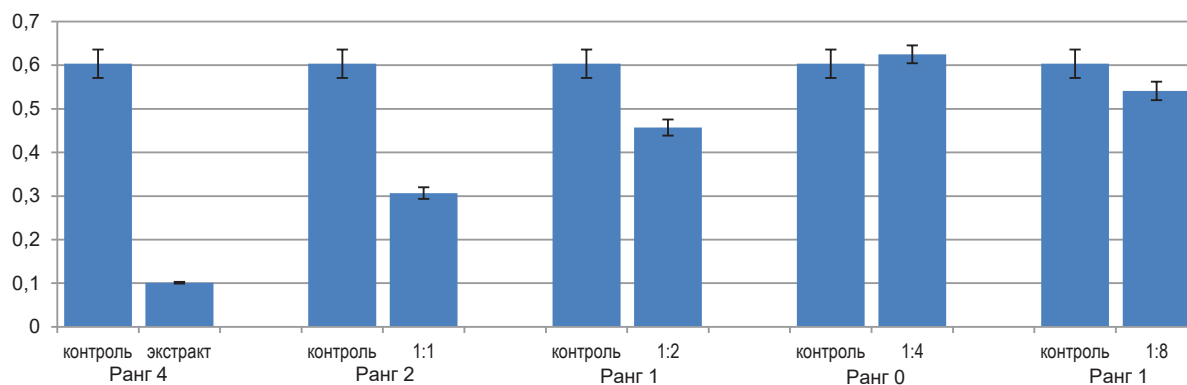


Рис. 10. Оптическая плотность экстракта, полученного из сополимера коллаген–поли-*N*-изопропилакриламид, синтезированного в присутствии системы триэтилбор–гексаметилендиамин – 2,5-ди-*трет*-бутил-*п*-бензохинон, и его разведений в соотношении с контролем (MTT-тест)

Fig. 10. Optical density of the extract obtained from the collagen–poly-*N*-isopropylacrylamide copolymer synthesized in the presence of the system triethylbor–hexamethylenediamine – 2,5-di-*трет*-butyl-*p*-benzoquinone and its dilutions in relation to the control (MTT assay)

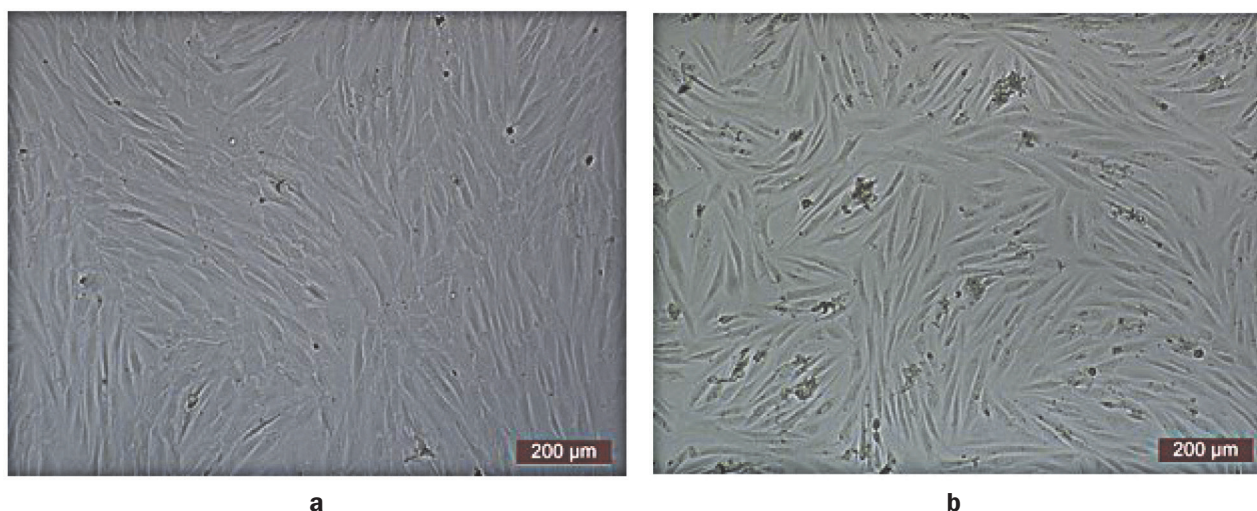


Рис. 11. Репрезентативные микрофотоснимки: а – контроль, среда без сополимера; б – с экстрактом сополимера коллаген–поли-*N*-изопропилакриламид, синтезированного в присутствии системы триэтилбор–гексаметилендиамин – 2,5-ди-*трет*-бутил-*п*-бензохинон, разведение экстракта 1:4

Fig. 11. Representative micrographs: a – control, medium without copolymer; b – with an extract of the collagen–poly-*N*-isopropylacrylamide copolymer synthesized in the presence of the system triethylbor–hexamethylenediamine – 2,5-di-*трет*-butyl-*p*-benzoquinone, dilution of the extract 1:4

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования выявлено, что привитая полимеризация АА на коллаген в присутствии комплекса ТЭБ с ГМДА и ряда *п*-хинонов приводит к образованию сополимеров сшитой структуры, эффективность прививки определяется строением мономера и *п*-хинона. Это подтверждается методом ГПХ. Замедление ферментативного гидролиза по сравнению с гидролизом чистого коллагена является доказательством существования стерических препятствий для его осуществления, то есть образованием сополимера. Во всех случаях *п*-хиноны ведут себя как замедлители

полимеризации, кроме БХ при полимеризации АА, где привитой ПАА отсутствует. Соплимеры проявляют высокую токсичность, обусловленную присутствием непрореагировавших мономеров. При разбавлении токсичность сополимеров коллагена и АА сохраняется, а сополимера коллагена и НИПА исчезает. Разработанная методика позволяет синтезировать сшитые сополимеры коллагена и АА, токсичность которых можно исключить путем разведения или экстракции. Все это позволяет в перспективе рассматривать полученные сополимеры в качестве материалов для регенеративной медицины.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Jagtap J.S., Labhade S.D., Chitlange S.S., Mahadevan S. Biopolymer conjugated protein based hydrogel scaffolds for tissue engineering application //

International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research. 2020. Vol. 17, no. 2. P. 284–316.

2. Kirillova A., Yeazel T.R., Asheghali D., Petersen S.R., Dort S., Gall K., et al. Fabrication of biomedical scaffolds using biodegradable polymers // *Chemical Reviews*. 2021. Vol. 121, no. 18. P. 11238–11304. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c01200.
3. Wang Y., Wang Z., Dong Y. Collagen-based biomaterials for tissue engineering // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2023. Vol. 9, no. 3. P. 132–1150. DOI: 10.1021/acsbomaterials.2c00730.
4. Dewle A., Pathak N., Rakshasmare P., Srivastava A. Multifarious fabrication approaches of producing aligned collagen scaffolds for tissue engineering applications // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2020. Vol. 6, no. 2. P. 779–797. DOI: 10.1021/acsbomaterials.9b01225.
5. Sundar G., Joseph J., Prabhakumari C., John A., Abraham A. Natural collagen bioscaffolds for skin tissue engineering strategies in burns: a critical review // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2021. Vol. 70, no. 9. P. 593–604. DOI: 10.1080/00914037.2020.1740991.
6. Subhan F., Hussain Z., Tauseef I., Shehzad A., Wahid F. A review on recent advances and applications of fish collagen // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021. Vol. 61, no. 6. P. 1027–1037. DOI: 10.1080/10408398.2020.1751585.
7. Lin K., Zhang D., Macedo M.H., Cui W., Sarmiento B., Shen G. Advanced collagen-based biomaterials for regenerative biomedicine // *Advanced Functional Materials*. 2019. Vol. 29, no. 3. P. 1804943. DOI: 10.1002/adfm.201804943.
8. Zheng M., Wang X., Chen Y., Yue O., Bai Z., Cui B., et al. A review of recent progress on collagen-based biomaterials // *Advanced Healthcare Materials*. 2023. Vol. 12, no. 16. P. 2202042. DOI: 10.1002/adhm.202202042.
9. Rico-Llanos G.A., Borrego-González S., Moncayo-Donoso M., Becerra J., Visser R. Collagen type I biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering // *Polymers*. 2021. Vol. 13, no. 4. P. 599. DOI: 10.3390/polym13040599.
10. Vijayalekha A., Anandasadagopan S.K., Pandurangan A.K. An overview of collagen-based composite scaffold for bone tissue engineering // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2023. Vol. 195. P. 4617–4636. DOI: 10.1007/s12010-023-04318-y.
11. Shekhter A.B., Fayzullin A.L., Vukolova M.N., Rudenko T.G., Osipychcheva V.D., Litvitsky P.F. Medical applications of collagen and collagen-based materials // *Current Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 26, no. 3. P. 506–516. DOI: 10.2174/0929867325666171205170339.
12. Fassini D., Wilkie I.C., Pozzolini M., Ferrario C., Sugni M., Rocha M.S., et al. Diverse and productive source of biopolymer inspiration: marine collagens // *Biomacromolecules*. 2021. Vol. 22, no. 5. P. 1815–1834. DOI: 10.1021/acs.biomac.1c00013.
13. Rahman M.A. Collagen of extracellular matrix from marine invertebrates and its medical applications // *Marine Drugs*. 2019. Vol. 17, no. 2. P. 118. DOI: 10.3390/md17020118.
14. Coppola D., Oliviero M., Vitale G.A., Lauritano C., D'Ambra I., Iannace S., et al. Marine collagen from alternative and sustainable sources: extraction, processing and applications // *Marine Drugs*. 2020. Vol. 18, no. 4. P. 214. DOI: 10.3390/md18040214.
15. Jafari H., Lista A., Siekapen M.M., Ghaffari-Bohlouli P., Nie L., Alimoradi H., et al. Fish collagen: extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering // *Polymers*. 2020. Vol. 12, no. 10. P. 2230. DOI: 10.3390/polym12102230.
16. Rajabimashhadi Z., Gallo N., Salvatore L., Lionetto F. Collagen derived from fish industry waste: progresses and challenges // *Polymers*. 2023. Vol. 15, no. 3. P. 544. DOI: 10.3390/polym15030544.
17. Salvatore L., Gallo N., Natali M.L., Campa L., Lunetti P., Madaghiele M., et al. Marine collagen and its derivatives: versatile and sustainable bio-resources for healthcare // *Materials Science & Engineering C*. 2020. Vol. 113. P. 110963. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110963.
18. Hu Y., Liu L., Gu Z., Dan W., Dan N., Yu X. Modification of collagen with a natural derived cross-linker, alginate dialdehyde // *Carbohydrate Polymers*. 2014. Vol. 102. P. 324–332. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.11.050.
19. Fathima N.N., Rao J.R., Nair B.U. Effect of UV irradiation on the physico-chemical properties of iron crosslinked collagen // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2011. Vol. 105, no. 3. P. 203–206. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2011.09.003.
20. Cao S., Li H., Li K., Lu J., Zhang L. A dense and strong bonding collagen film for carbon/carbon composites // *Applied Surface Science*. 2015. Vol. 347. P. 307–314. DOI: 10.1016/j.apsusc.2015.04.081.
21. Zeugolis D.I., Paul G.R., Attenburrow G. Cross-linking of extruded collagen fibers – a biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009. Vol. 89A, no. 4. P. 895–908. DOI: 10.1002/jbm.a.32031.
22. Zhou X., Wang J., Fang W., Tao Y., Zhao T., Xia K., et al. Genipin cross-linked type II collagen/chondroitin sulfate composite hydrogel-like cell delivery system induces differentiation of adipose-derived stem cells and regenerates degenerated nucleus pulposus // *Acta Biomaterialia*. 2018. Vol. 71. P. 496–509. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.03.019.
23. Goodarzi H., Jadidi K., Pourmotabed S., Sharifi E., Aghamollaei H. Preparation and *in vitro* characterization of cross-linked collagen–gelatin hydrogel using EDC/NHS for corneal tissue engineering applications // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. Vol. 126. P. 620–632. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.125.
24. Mu C., Liu F., Cheng Q., Li H., Wu B., Zhang G., et al. Collagen cryogel cross-linked by dialdehyde starch // *Macromolecular Materials and Engineering*. 2010. Vol. 295, no. 2. P. 100–107. DOI: 10.1002/mame.200900292.
25. Chen Z.G., Wang P.W., Wei B., Mo X.M., Cui F.Z. Electrospun collagen–chitosan nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell // *Acta Biomaterialia*. 2010. Vol. 6, no. 2. P. 372–382. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.07.024.
26. Kaur S., Jindal R. Synthesis of interpenetrating network hydrogel from (gum copal alcohols–collagen)–co–poly(acrylamide) and acrylic acid: Isotherms and kinetics study for removal of methylene blue dye from aqueous solution // *Materials Chemistry and Physics*. 2018. Vol. 220. P. 75–86. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2018.08.008.
27. Ding C., Zhang M., Ma M., Zheng J., Yang Q., Feng R. Thermal and pH dual-responsive hydrogels based on semi-interpenetrating network of poly(*N*-isopropylacryl-

amide) and collagen nanofibrils // *Polymer International*. 2019. Vol. 68, no. 8. P. 1468–1477. DOI: 10.1002/pi.5852.

28. Luneva O.V., Fateev A.D., Kashurin A.I., Uspenskaya M.V. Study of the properties of semi-interpenetrating networks based on acrylic hydrogel and collagen // *Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Химия*. 2022. Т. 15. N 3. С. 318–328. DOI: 10.17516/1998-2836-0295. EDN: DQGEBR.

29. Zhang M., Deng F., Tang L., Wu H., Ni Y., Chen L., et al. Super-ductile, injectable, fast self-healing collagen-based hydrogels with multi-responsive and accelerated wound-repair properties // *Chemical Engineering Journal*. 2021. Vol. 405. P. 126756. DOI: 10.1016/j.cej.2020.126756.

30. Ullah K., Khan S.A., Murtaza G., Sohail M., Azizullah, Manan A., et al. Gelatin-based hydrogels as potential biomaterials for colonic delivery of oxaliplatin // *International Journal of Pharmaceutics*. 2019. Vol. 556. P. 236–245. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.020.

31. Baek K., Clay N.E., Qin E.C., Sullivan K.M., Kim D.H., Kong H. *In situ* assembly of the collagen–polyacrylamide interpenetrating network hydrogel: Enabling decoupled control of stiffness and degree of swelling // *European Polymer Journal*. 2015. Vol. 72. P. 413–422. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.07.044.

32. Khanna N.D., Kaur I., Bhalla T.C., Gautam N. Effect of biodegradation on thermal and crystalline behavior of polypropylene–gelatin based copolymers // *Journal of Applied Polymer Science*. 2010. Vol. 118, no. 3. P. 1476–1488. DOI: 10.1002/app.32434.

33. Bas O., De-Juan-Pardo E.M., Chhaya M.P., Wunner F.M., Jeon J.E., Klein T.J., et al. Enhancing structural integrity of hydrogels by using highly organised melt electrospun fibre constructs // *European Polymer Journal*. 2015. Vol. 72. P. 451–463. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.07.034.

34. Fujisawa S., Kadoma Y. Tri-*n*-butylborane/watercomplex-mediated copolymerization of methyl methacrylate with proteinaceous materials and proteins: a review // *Polymers*. 2010. Vol. 2, no. 4. P. 575–595. DOI: 10.3390/polym2040575.

35. Okamura H., Sudo A., Endo T. Generation of radical species on polypropylene by alkylborane-oxygen system and its application to graft polymerization // *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 2009. Vol. 47, no. 22. P. 6163–6167. DOI: 10.1002/pola.23659.

36. Liu S., Zheng Z., Li M., Wang X. Effect of oxidation progress of tributylborane on the grafting of polyolefins // *Journal of Applied Polymer Science*. 2012. Vol. 125, no. 5. P. 3335–3344. DOI: 10.1002/app.34232.

37. Komabayashi T., Zhu Q., Eberhart R., Imai Y. Current status of direct pulp-capping materials for permanent teeth // *Dental Materials Journal*. 2016. Vol. 35, no. 1. P. 1–12. DOI: 10.4012/dmj.2015-013.

38. Sonnenschein M.F., Redwine O.D., Wendt B.L., Kastl P.E. Colloidal encapsulation of hydrolytically and oxidatively unstable organoborane catalysts and their use in waterborne acrylic polymerization // *Langmuir*. 2009. Vol. 25, no. 21. P. 12488–12494. DOI: 10.1021/la9017079.

39. Dodonov V.A., Starostina T.I. Radical bonding thermoplastics and materials with low surface energy using acrylate compositions // *Polymer Science, Series D*. 2018. Vol. 11. P. 60–66. DOI: 10.1134/S1995421218010069.

40. Wilson O.R., Borrelli D.J., Magenau A.J.D. Simple

and rapid adhesion of commodity polymer substrates under ambient conditions using complexed alkylboranes. *ACS Omega*. 2022. Vol. 7, no. 32. P. 28636–28645. DOI: 10.1021/acsomega.2c03740.

41. Kuznetsova Yu.L., Morozova E.A., Sustaeva K.S., Markin A.V., Mitin A.V., Baten'kin M.A., et al. Tributylborane in the synthesis of graft copolymers of collagen and polymethyl methacrylate // *Russian Chemical Bulletin*. 2022. Vol. 71. P. 389–398. DOI: 10.1007/s11172-022-3424-3.

42. Kuznetsova Yu.L., Sustaeva K.S., Mitin A.V., Zakharychev E.A., Egorikhina M.N., Chasova V.O., et al. Graft polymerization of acrylamide in an aqueous dispersion of collagen in the presence of tributylborane // *Polymers*. 2022. Vol. 14, no. 22. P. 4900. DOI: 10.3390/polym14224900.

43. Uromicheva M.A., Kuznetsova Y.L., Valetova N.B., Mitin A.V., Semenycheva L.L., Smirnova O.N. Synthesis of grafted polybutyl acrylate copolymer on fish collagen // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 1. С. 16–25. DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-1-16-25. EDN: IJBHH.

44. Semenycheva L., Chasova V.O., Pegeev N.L., Uromicheva M.A., Mitin A.V., Kuznetsova Yu.L., et al. Production of graft copolymers of cod collagen with butyl acrylate and vinyl butyl ether in the presence of triethylborane – prospects for use in regenerative medicine // *Polymers*. 2023. Vol. 15, no. 15. P. 3159. DOI: 10.3390/polym15153159.

45. Kuznetsova Yu.L., Gushchina K.S., Lobanova K.S., Chasova V.O., Egorikhina M.N., Grigoryeva A.O., et al. Scaffold chemical model based on collagen–methyl methacrylate graft copolymers // *Polymers*. 2023. Vol. 15, no. 12. P. 2618. DOI: 10.3390/polym15122618.

46. Kuznetsova Yu., Gushchina K., Sustaeva K., Mitin A., Egorikhina M., Chasova V., et al. Grafting of methyl methacrylate onto gelatin initiated by tri-butylborane–2,5-di-*tert*-butyl-*p*-benzoquinone system // *Polymers*. 2022. Vol. 14, no. 16. P. 3290. DOI: 10.3390/polym14163290.

47. Kuznetsova Yu.L., Morozova E.A., Vavilova A.S., Markin A.V., Smirnova O.N., Zakharycheva N.S., et al. Synthesis of biodegradable grafted copolymers of gelatin and polymethyl methacrylate // *Polymer Science, Series D*. 2020. Vol. 13. P. 453–459. DOI: 10.1134/S1995421220040115.

48. Kuznetsova Yu.L., Sustaeva K.S., Vavilova A.S., Markin A.V., Lyakaev D.V., Mitin A.V., et al. Tributylborane in the synthesis of graft-copolymers of gelatin and acrylamide // *Journal of Organometallic Chemistry*. 2020. Vol. 924. P. 121431. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2020.121431.

49. Пат. № 2567171, Российская Федерация, МПК C08H 1/06, A23J 1/04. Способ получения укусной дисперсии высокомолекулярного рыбного коллагена / Л.А. Семенычева, М.В. Астанина, Ю.А. Кузнецова, Н.Б. Валетова, Е.В. Гераськина, О.А. Таранкова. Заявл. 06.10.2014; опубл. 10.11.2015. Бюл. № 31.

50. Simándi T.L., Tüdös F. Kinetics of radical polymerization–XLV. Steric effects in the radical reactivity of quinones // *European Polymer Journal*. 1985. Vol. 21, no. 10. P. 865–869. DOI: 10.1016/0014-3057(85)90165-X.

51. Nistor M.-T., Pamfil D., Schick C., Vasile C. Study of the heat-induced denaturation and water state of hybrid hydrogels based on collagen and poly (*N*-isopropyl acrylamide) in hydrated conditions // *Thermochimica Acta*. 2014. Vol. 589. P. 114–122. DOI: 10.1016/j.tca.2014.05.020.

52. Kalinina E.A., Vavilova A.S., Sustaeva K.S., Kuznetsova Yu.L. Polymerization of alkyl (meth)acrylates in the presence

of *p*-quinones // *Russian Chemical Bulletin*. 2021. Vol. 70. P. 1775–1783. DOI: 10.1007/s11172-021-3282-4.

53. Dodonov V.A., Kuznetsova Yu.L., Vilkova A.I., Skuchilina A.S., Nevodchikov V.I., Beloded L.N. Uncontrolled pseudoliving free-radical polymerization of methyl methacrylate in the presence of butyl-*p*-benzoquinones // *Russian Chemical Bulletin*. 2007. Vol. 56. P. 1162–1165. DOI: 10.1007/s11172-007-0176-z.

54. Semenycheva L.L., Egorikhina M.N., Chasova V.O.,

Valetova N.B., Podguzkova M.V., Astanina M.V., et al. Enzymatic hydrolysis of collagen by pancreatin and thrombin as a step in the formation of scaffolds // *Russian Chemical Bulletin*. 2020. Vol. 69. P. 164–168. DOI: 10.1007/s11172-020-2738-2.

55. Bender M.L., Bergeron R.J., Komiyama M. The bioorganic chemistry of enzymatic catalysis. New York. Wiley-Interscience, 1984. 312 p.

REFERENCES

1. Jagtap J.S., Labhade S.D., Chitlange S.S., Mahadevan S. Biopolymer conjugated protein based hydrogel scaffolds for tissue engineering application. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research*. 2020;17(2):284-316.

2. Kirillova A., Yeazel T.R., Asheghali D., Petersen S.R., Dort S., Gall K., et al. Fabrication of biomedical scaffolds using biodegradable polymers. *Chemical Reviews*. 2021;121(18):11238-11304. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c01200.

3. Wang Y., Wang Z., Dong Y. Collagen-based biomaterials for tissue engineering. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2023;9(3):1132-1150. DOI: 10.1021/acsbmaterials.2c00730.

4. Dewle A., Pathak N., Rakshasmare P., Srivastava A. Multifarious fabrication approaches of producing aligned collagen scaffolds for tissue engineering applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2020;6(2):779-797. DOI: 10.1021/acsbmaterials.9b01225.

5. Sundar G., Joseph J., Prabhakumari C., John A., Abraham A. Natural collagen bioscaffolds for skin tissue engineering strategies in burns: a critical review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2021;70(9):593-604. DOI: 10.1080/00914037.2020.1740991.

6. Subhan F., Hussain Z., Tauseef I., Shehzad A., Wahid F. A review on recent advances and applications of fish collagen. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021;61(6):1027-1037. DOI: 10.1080/10408398.2020.1751585.

7. Lin K., Zhang D., Macedo M.H., Cui W., Sarmiento B., Shen G. Advanced collagen-based biomaterials for regenerative biomedicine. *Advanced Functional Materials*. 2019;29(3):1804943. DOI: 10.1002/adfm.201804943.

8. Zheng M., Wang X., Chen Y., Yue O., Bai Z., Cui B., et al. A review of recent progress on collagen-based biomaterials. *Advanced Healthcare Materials*. 2023;12(16):2202042. DOI: 10.1002/adhm.202202042.

9. Rico-Llanos G.A., Borrego-González S., Moncayo-Donoso M., Becerra J., Visser R. Collagen type I biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering. *Polymers*. 2021;13(4):599. DOI: 10.3390/polym13040599.

10. Vijayalekha A., Anandasadagopan S.K., Pandurangan A.K. An overview of collagen-based composite scaffold for bone tissue engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2023;195:4617-4636. DOI: 10.1007/s12010-023-04318-y.

11. Shekhter A.B., Fayzullin A.L., Vukolova M.N., Rudenko T.G., Osipycheva V.D., Litvitsky P.F. Medical applications of collagen and collagen-based materials. *Current Medicinal Chemistry*. 2019;26(3):506-516. DOI: 10.2174/0929867325666171205170339.

12. Fassini D., Wilkie I.C., Pozzolini M., Ferrario C., Sugni M., Rocha M.S., et al. Diverse and productive source of biopolymer inspiration: marine collagens. *Biomacromolecules*. 2021;22(5):1815-1834. DOI: 10.1021/acs.biomac.1c00013.

13. Rahman M.A. Collagen of extracellular matrix from marine invertebrates and its medical applications. *Marine Drugs*. 2019;17(2):118. DOI: 10.3390/md17020118.

14. Coppola D., Oliviero M., Vitale G.A., Lauritano C., D'Ambra I., Iannace S., et al. Marine collagen from alternative and sustainable sources: extraction, processing and applications. *Marine Drugs*. 2020;18(4):214. DOI: 10.3390/md18040214.

15. Jafari H., Lista A., Siekapen M.M., Ghaffari-Bohlouli P., Nie L., Alimoradi H., et al. Fish collagen: extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering. *Polymers*. 2020;12(10):2230. DOI: 10.3390/polym12102230.

16. Rajabimashhadi Z., Gallo N., Salvatore L., Lionetto F. Collagen derived from fish industry waste: progresses and challenges. *Polymers*. 2023;15(3):544. DOI: 10.3390/polym15030544.

17. Salvatore L., Gallo N., Natali M.L., Campa L., Lunetti P., Madaghiele M., et al. Marine collagen and its derivatives: versatile and sustainable bio-resources for healthcare. *Materials Science & Engineering C*. 2020;113:110963. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110963.

18. Hu Y., Liu L., Gu Z., Dan W., Dan N., Yu X. Modification of collagen with a natural derived cross-linker, alginate dialdehyde. *Carbohydrate Polymers*. 2014;102:324-332. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.11.050.

19. Fathima N.N., Rao J.R., Nair B.U. Effect of UV irradiation on the physico-chemical properties of iron crosslinked collagen. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2011;105(3):203-206. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2011.09.003.

20. Cao S., Li H., Li K., Lu J., Zhang L. A dense and strong bonding collagen film for carbon/carbon composites. *Applied Surface Science*. 2015;347:307-314. DOI: 10.1016/j.apsusc.2015.04.081.

21. Zeugolis D.I., Paul G.R., Attenburrow G. Cross-linking of extruded collagen fibers – a biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009;89A(4):895-908. DOI: 10.1002/jbm.a.32031.

22. Zhou X., Wang J., Fang W., Tao Y., Zhao T., Xia K., et al. Genipin cross-linked type II collagen/chondroitin sulfate composite hydrogel-like cell delivery system induces differentiation of adipose-derived stem cells and regenerates degenerated nucleus pulposus. *Acta Biomaterialia*. 2018;71:496-509. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.03.019.

23. Goodarzi H., Jadidi K., Pourmotabed S., Sharifi E., Aghamollaei H. Preparation and *in vitro* characterization

of cross-linked collagen–gelatin hydrogel using EDC/NHS for corneal tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;126:620-632. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.125.

24. Mu C., Liu F., Cheng Q., Li H., Wu B., Zhang G., et al. Collagen cryogel cross-linked by dialdehyde starch. *Macromolecular Materials and Engineering*. 2010;295(2):100-107. DOI: 10.1002/mame.200900292.

25. Chen Z.G., Wang P.W., Wei B., Mo X.M., Cui F.Z. Electrospun collagen–chitosan nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(2):372-382. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.07.024.

26. Kaur S., Jindal R. Synthesis of interpenetrating network hydrogel from (gum copal alcohols-collagen)-copoly(acrylamide) and acrylic acid: Isotherms and kinetics study for removal of methylene blue dye from aqueous solution. *Materials Chemistry and Physics*. 2018;220:75-86. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2018.08.008.

27. Ding C., Zhang M., Ma M., Zheng J., Yang Q., Feng R. Thermal and pH dual-responsive hydrogels based on semi-interpenetrating network of poly(*N*-isopropylacrylamide) and collagen nanofibrils. *Polymer International*. 2019;68(8):1468-1477. DOI: 10.1002/pi.5852.

28. Luneva O.V., Fateev A.D., Kashurin A.I., Uspenskaya M.V. Study of the properties of semi-interpenetrating networks based on acrylic hydrogel and collagen. *Journal of Siberian Federal University. Chemistry*. 2022;15(3):318-328. DOI: 10.17516/1998-2836-0295. EDN: DQGEBR.

29. Zhang M., Deng F., Tang L., Wu H., Ni Y., Chen L., et al. Super-ductile, injectable, fast self-healing collagen-based hydrogels with multi-responsive and accelerated wound-repair properties. *Chemical Engineering Journal*. 2021;405:126756. DOI: 10.1016/j.cej.2020.126756.

30. Ullah K., Khan S.A., Murtaza G., Sohail M., Azizullah, Manan A., et al. Gelatin-based hydrogels as potential biomaterials for colonic delivery of oxaliplatin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;556:236-245. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.020.

31. Baek K., Clay N.E., Qin E.C., Sullivan K.M., Kim D.H., Kong H. *In situ* assembly of the collagen–polyacrylamide interpenetrating network hydrogel: Enabling decoupled control of stiffness and degree of swelling. *European Polymer Journal*. 2015;72:413-422. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.07.044.

32. Khanna N.D., Kaur I., Bhalla T.C., Gautam N. Effect of biodegradation on thermal and crystalline behavior of polypropylene–gelatin based copolymers. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010;118(3):1476-1488. DOI: 10.1002/app.32434.

33. Bas O., De-Juan-Pardo E.M., Chhaya M.P., Wunner F.M., Jeon J.E., Klein T.J., et al. Enhancing structural integrity of hydrogels by using highly organised melt electrospun fibre constructs. *European Polymer Journal*. 2015;72:451-463. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.07.034.

34. Fujisawa S., Kadoma Y. Tri-*n*-butylborane/watercomplex-mediated copolymerization of methyl methacrylate with proteinaceous materials and proteins: a review. *Polymers*. 2010;2(4):575-595. DOI: 10.3390/polym2040575.

35. Okamura H., Sudo A., Endo T. Generation of radical species on polypropylene by alkylborane-oxygen system and its application to graft polymerization. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 2009;47(22):6163-

6167. DOI: 10.1002/pola.23659.

36. Liu S., Zheng Z., Li M., Wang X. Effect of oxidation progress of tributylborane on the grafting of polyolefins. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012;125(5):3335-3344. DOI: 10.1002/app.34232.

37. Komabayashi T., Zhu Q., Eberhart R., Imai Y. Current status of direct pulp-capping materials for permanent teeth. *Dental Materials Journal*. 2016;35(1):1-12. DOI: 10.4012/dmj.2015-013.

38. Sonnenschein M.F., Redwine O.D., Wendt B.L., Kastl P.E. Colloidal encapsulation of hydrolytically and oxidatively unstable organoborane catalysts and their use in waterborne acrylic polymerization. *Langmuir*. 2009;25(21):12488-12494. DOI: 10.1021/la9017079.

39. Dodonov V.A., Starostina T.I. Radical bonding thermoplastics and materials with low surface energy using acrylate compositions. *Polymer Science, Series D*. 2018;11:60-66. DOI: 10.1134/S1995421218010069.

40. Wilson O.R., Borrelli D.J., Magenau A.J.D. Simple and rapid adhesion of commodity polymer substrates under ambient conditions using complexed alkylboranes. *ACS Omega*. 2022;7(32):28636-28645. DOI: 10.1021/acsomega.2c03740.

41. Kuznetsova Yu.L., Morozova E.A., Sustaeva K.S., Markin A.V., Mitin A.V., Baten'kin M.A., et al. Tributylborane in the synthesis of graft copolymers of collagen and polymethyl methacrylate. *Russian Chemical Bulletin*. 2022;71:389-398. DOI: 10.1007/s11172-022-3424-3.

42. Kuznetsova Yu.L., Sustaeva K.S., Mitin A.V., Zakharychev E.A., Egorikhina M.N., Chasova V.O., et al. Graft polymerization of acrylamide in an aqueous dispersion of collagen in the presence of tributylborane. *Polymers*. 2022;14(22):4900. DOI: 10.3390/polym14224900.

43. Uromicheva M.A., Kuznetsova Y.L., Valetova N.B., Mitin A.V., Semenycheva L.L., Smirnova O.N. Synthesis of grafted polybutyl acrylate copolymer on fish collagen. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):16-25. DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-1-16-25. EDN: IJBJHH.

44. Semenycheva L., Chasova V.O., Pegeev N.L., Uromicheva M.A., Mitin A.V., Kuznetsova Yu.L., et al. Production of graft copolymers of cod collagen with butyl acrylate and vinyl butyl ether in the presence of triethylborane – prospects for use in regenerative medicine. *Polymers*. 2023;15(15):3159. DOI: 10.3390/polym15153159.

45. Kuznetsova Yu.L., Gushchina K.S., Lobanova K.S., Chasova V.O., Egorikhina M.N., Grigoryeva A.O., et al. Scaffold chemical model based on collagen–methyl methacrylate graft copolymers. *Polymers*. 2023;15(12):2618. DOI: 10.3390/polym15122618.

46. Kuznetsova Yu., Gushchina K., Sustaeva K., Mitin A., Egorikhina M., Chasova V., et al. Grafting of methyl methacrylate onto gelatin initiated by tri-butylborane–2,5-di-tert-butyl-*p*-benzoquinone system. *Polymers*. 2022;14(16):3290. DOI: 10.3390/polym14163290.

47. Kuznetsova Yu.L., Morozova E.A., Vavilova A.S., Markin A.V., Smirnova O.N., Zakharycheva N.S., et al. Synthesis of biodegradable grafted copolymers of gelatin and polymethyl methacrylate. *Polymer Science, Series D*. 2020;13:453-459. DOI: 10.1134/S1995421220040115.

48. Kuznetsova Yu.L., Sustaeva K.S., Vavilova A.S., Markin A.V., Lyakaev D.V., Mitin A.V., et al. Tributylborane in the synthesis of graft-copolymers of gelatin and acrylamide.

Journal of Organometallic Chemistry. 2020;924:121431. DOI: 10.1016/j.jorganchem.2020.121431.

49. Semenycheva L.L., Astanina M.V., Kuznetsova Yu.L., Valetova N.B., Geras'kina E.V., Tarankova O.A. *Method for production of acetic dispersion of high molecular fish collagen*. Patent RF, no. 2567171; 2015.

50. Simándi T.L., Tüdös F. Kinetics of radical polymerization-XLV. Steric effects in the radical reactivity of quinones. *European Polymer Journal*. 1985;21(10):865-869. DOI: 10.1016/0014-3057(85)90165-X.

51. Nistor M.-T., Pamfil D., Schick C., Vasile C. Study of the heat-induced denaturation and water state of hybrid hydrogels based on collagen and poly (*N*-isopropyl acrylamide) in hydrated conditions. *Thermochimica Acta*. 2014;589:114-122. DOI: 10.1016/j.tca.2014.05.020.

52. Kalinina E.A., Vavilova A.S., Sustaeва K.S., Kuznetsova Yu.L. Polymerization of alkyl (meth)acrylates

in the presence of *p*-quinones. *Russian Chemical Bulletin*. 2021;70:1775-1783. DOI: 10.1007/s11172-021-3282-4.

53. Dodonov V.A., Kuznetsova Yu.L., Vilkova A.I., Skuchilina A.S., Nevodchikov V.I., Beloded L.N. Uncontrolled pseudoliving free-radical polymerization of methyl methacrylate in the presence of butyl-*p*-benzoquinones. *Russian Chemical Bulletin*. 2007;56:1162-1165. DOI: 10.1007/s11172-007-0176-z.

54. Semenycheva L.L., Egorikhina M.N., Chasova V.O., Valetova N.B., Podguzkova M.V., Astanina M.V., et al. Enzymatic hydrolysis of collagen by pancreatin and thrombin as a step in the formation of scaffolds. *Russian Chemical Bulletin*. 2020;69:164-168. DOI: 10.1007/s11172-020-2738-2.

55. Bender M.L., Bergeron R.J., Komiyama M. *The bioorganic chemistry of enzymatic catalysis*. New York. Wiley-Interscience; 1984, 312 p.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Кузнецова Юлия Леонидовна,

к.х.н., доцент, доцент,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
✉ kyul@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4151-9266>

Гущина Ксения Сергеевна,

аспирант, младший научный сотрудник,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
kshesha.gushchina@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2745-251X>

Лобанова Карина Сергеевна,

аспирант, младший научный сотрудник,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
kariandrs2101@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1132-7212>

Румянцева Виктория Олеговна,

младший научный сотрудник,
Научно-исследовательский институт химии,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
11.04.96@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8038-8441>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Yulia L. Kuznetsova,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Associate Professor,
National Research Lobachevsky
State University of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603022,
Russian Federation,
✉ kyul@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4151-9266>

Ksenya S. Gushchina,

Postgraduate Student, Junior Researcher,
National Research Lobachevsky
State University of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603022,
Russian Federation,
kshesha.gushchina@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2745-251X>

Karina S. Lobanova,

Postgraduate Student, Junior Researcher,
National Research Lobachevsky
State University of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603022,
Russian Federation,
kariandrs2101@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1132-7212>

Victoria O. Rumyantseva,

Junior Researcher,
Research Institute of Chemistry,
National Research Lobachevsky
State University of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603022,
Russian Federation,
11.04.96@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8038-8441>

Егорихина Марфа Николаевна,
к.б.н., заведующий научной лабораторией,
Научно-исследовательский институт
экспериментальной онкологии
и биомедицинских технологий,
Приволжский исследовательский
медицинский университет Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина
и Пожарского, 10/1, Российская Федерация,
egorihina.marfa@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8815-9651>

Фарафونتова Екатерина Александровна,
лаборант,
Научно-исследовательский институт
экспериментальной онкологии
и биомедицинских технологий,
Приволжский исследовательский
медицинский университет Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина
и Пожарского, 10/1, Российская Федерация,
ekaterina_farafontova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7940-0880>

Рубцова Юлия Павловна,
к.б.н., научный сотрудник,
Научно-исследовательский институт
экспериментальной онкологии
и биомедицинских технологий,
Приволжский исследовательский
медицинский университет Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина
и Пожарского, 10/1, Российская Федерация,
rubincherry@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2781-6419>

Семенычева Людмила Леонидовна,
д.х.н., доцент, заведующий лабораторией,
Научно-исследовательский институт химии,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
lsem@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3413-2899>

Вклад авторов

Ю.Л. Кузнецова – концептуализация,
разработка методологии исследования,
научное руководство исследованием,
анализ и интерпретация данных,
написание и редактирование текста статьи.
К.С. Гущина – синтез сополимеров,
подготовка и написание черновика
рукописи, визуализация.
К.С. Лобанова – синтез сополимеров,
проведение ферментативного гидролиза
коллагеназой.

Marfa N. Egorikhina,
Cand. Sci. (Biology), Head
of the Scientific Laboratory,
Research Institute of Experimental Oncology
and Biomedical Technologies,
Privolzhsky Research Medical University,
10/1, Minin i Pozharsky Sq., Nizhny Novgorod,
603005, Russian Federation,
egorihina.marfa@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8815-9651>

Ekaterina A. Farafontova,
Laboratory Assistant,
Research Institute of Experimental Oncology
and Biomedical Technologies,
Privolzhsky Research Medical University,
10/1, Minin i Pozharsky Sq., Nizhny Novgorod,
603005, Russian Federation,
ekaterina_farafontova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7940-0880>

Yulia P. Rubtsova,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Research Institute of Experimental Oncology
and Biomedical Technologies,
Privolzhsky Research Medical University,
10/1, Minin i Pozharsky Sq., Nizhny Novgorod,
603005, Russian Federation,
rubincherry@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2781-6419>

Luydmila L. Semenicheva,
Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Head of the Laboratory,
Research Institute of Chemistry,
National Research Lobachevsky
State University of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603022,
Russian Federation,
lsem@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3413-2899>

Contribution of the authors

Yulia L. Kuznetsova – conceptualization, research
methodology development, scientific supervision
of the study, data analysis and interpretation,
writing and editing the text of manuscript.
Ksenya S. Gushchina – copolymers synthesis,
preparing and writing a draft manuscript,
visualization.
Karina S. Lobanova – copolymers synthesis,
collagenase enzymatic hydrolysis.

В.О. Румянцева – проведение ферментативного гидролиза панкреатином, анализ методами гель-проникающей хроматографии и растровой электронной микроскопии.

М.Н. Егорихина – проведение и описание МТТ-теста, редактирование текста статьи.

Е.А. Фарафонтова – проведение и описание МТТ-теста.

Ю.П. Рубцова – проведение и описание МТТ-теста.

Л.А. Семенычева – разработка методологии исследования, валидация данных, редактирование текста статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 15.11.2023.

Одобрена после рецензирования 04.04.2024.

Принята к публикации 30.08.2024.

Victoria O. Rumyantseva – pancreatin enzymatic hydrolysis, gel-penetrating chromatography, scanning electron microscopy.

Marfa N. Egorikhina – MTT assay, editing the manuscript.

Ekaterina A. Farafontova – MTT assay.

Yulia P. Rubtsova – MTT assay.

Luydmila L. Semenycheva – research methodology development, data validation, editing the manuscript.

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 15.11.2023.

Approved after reviewing 04.04.2024.

Accepted for publication 30.08.2024.



Диэлектрические параметры полимеров и мономеров винилового ряда в микроволновом диапазоне длин волн

А.Б. Алыева*, С.А. Ананичева***, Т.О. Крапивницкая****✉,
Е.В. Колякина**, М.Ю. Глявин*, В.В. Паршин*, Е.А. Серов*

*Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, Российская Федерация

**Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Российская Федерация

***Уфимский государственный нефтяной технический университет,
Уфа, Российская Федерация

Аннотация. Одной из быстроразвивающихся отраслей химической промышленности является производство полимерных материалов. Совершенствование способов синтеза высокомолекулярных соединений и изучение их физико-химических характеристик относятся к важным задачам синтетической химии. Основным методом получения полимерных материалов на данный момент является радикальная полимеризация, имеющая такие преимущества, как простота реализации процесса, низкая себестоимость, возможность получения широкого круга полимерных материалов. В представленной работе приведены результаты исследований диэлектрических параметров в диапазоне частот 100–200 ГГц (показателя преломления и тангенса угла диэлектрических потерь $\tan\delta$) различных высокомолекулярных соединений (полистирол, поливинилхлорид, поливинилацетат, поливиниловый спирт, полиглицидилметакрилат) – как синтезированных с участием традиционного инициатора динитрила азобисизомасляной кислоты по механизму радикальной полимеризации, так и коммерческих продуктов. Проведен сравнительный анализ поглощающей способности полимеров при комнатной температуре, определены полимеры, имеющие наибольшую и наименьшую поглощающую способность. Зависимость $\tan\delta$ от частоты для всех исследуемых полимеров имеет линейный характер, причем с увеличением частоты поглощение в полимерах увеличивается. Наибольшее поглощение среди изученных макромолекул имеет полиглицидилметакрилат, при 200 ГГц значение $\tan\delta$ составляет 0,043, а минимальное значение $\tan\delta$, равное 0,0068, зафиксировано у полистирола. Значение показателя преломления для исследованных полимеров изменяется в интервале от 1,09 до 1,39. Также представлены результаты исследований диэлектрических свойств исходных виниловых мономеров (стирол, винилацетат, глицидилметакрилат). Указанные данные представляют практический интерес при разработке подходов к получению полимерных материалов с заданными характеристиками на основе виниловых мономеров методом радикальной полимеризации.

Ключевые слова: измерение диэлектрических характеристик, спектрометр на основе открытого резонатора, полистирол, поливинилхлорид, полиглицидилметакрилат, поливинилацетат

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке государственного задания Института прикладной физики РАН на проведение научных исследований по теме № FFUF-2024-0027.

Для цитирования: Алыева А.Б., Ананичева С.А., Крапивницкая Т.О., Колякина Е.В., Глявин М.Ю., Паршин В.В. [и др.]. Диэлектрические параметры полимеров и мономеров винилового ряда в микроволновом диапазоне длин волн // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 323–330. DOI: 10.21285/achb.924. EDN: PUBDQY.

Dielectric parameters of polymers and monomers of the vinyl series in the microwave range

Alisa B. Alyeva*, Svetlana A. Ananicheva***, Tatiana O. Krapivnitckaia****✉,
Elena V. Kolyakina**, Mikhail Yu. Glyavin*, Vladimir V. Parshin*, Evgenii A. Serov*

*Institute of Applied Physics RAS, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

**Lobachevsky State University of Nizhniy Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

***Ufa State Petroleum Technical University, Ufa, Russian Federation

Abstract. The production of polymeric materials is one of the fast-growing sectors in the chemical industry. Improving methods for synthesizing high-molecular compounds and studying their physicochemical characteristics are important tasks of synthetic chemistry. Radical polymerization is currently the main method for producing polymeric materials. Its advantages involve simplicity and low cost, along with the possibility of obtaining a wide range of polymeric materials. The results of measuring the dielectric parameters of various high-molecular compounds (polystyrene, polyvinyl chloride, polyvinyl acetate, polyvinyl alcohol, poly(glycidyl methacrylate)) in the frequency range of 100–200 GHz (refractive index and dielectric loss tangent $\text{tg}\delta$) are presented. The compounds under study were both those synthesized by radical polymerization with the participation of the conventional initiator, i.e., azobisisobutyric acid dinitrile, and commercial products. The absorption capacity of polymers at room temperature was compared. Polymers with the highest and lowest absorption capacity were determined. The dependence of $\text{tg}\delta$ on frequency for all the polymers under study is linear, with absorption in the polymers increasing with frequency. Poly(glycidyl methacrylate) exhibits the highest absorption among the studied macromolecules with $\text{tg}\delta$ being equal to 0.043 at 200 GHz. The minimum $\text{tg}\delta$ value of 0.0068 was found for polystyrene. For the polymers under study, the refractive index value varies in the range from 1.09 to 1.39. In addition, dielectric properties of the original vinyl monomers (styrene, vinyl acetate, glycidyl methacrylate) were studied. The results are of interest when developing approaches to obtaining polymeric materials with specified characteristics based on vinyl monomers by the method of radical polymerization.

Keywords: measurement of dielectric characteristics, open resonator spectrometer, polystyrene, polyvinyl chloride, poly(glycidyl methacrylate), polyvinyl acetate

Funding. The research was carried out with the support of the state assignment of the Institute of Applied Physics of the Russian Academy of Sciences for scientific research on topic no. FFUF-2021-0001.

For citation: Alyeva A.B., Ananicheva S.A., Krapivnitckaia T.O., Kolyakina E.V., Glyavin M.Yu., Parshin V.V., et al. Dielectric parameters of polymers and monomers of the vinyl series in the microwave range. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):323-330. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.924. EDN: PUBDQY.

Введение

В настоящее время наблюдается большой интерес к высокомолекулярным соединениям, который обусловлен возможностью получать на их основе материалы с широким диапазоном физико-химических свойств, что создает условия для использования данных соединений в различных областях электроники и микроэлектроники в качестве конструкционного материала [1–3]. Одним из основных методов синтеза высокомолекулярных соединений является радикальная полимеризация, которая используется для крупнотоннажного производства полимерных материалов как на основе виниловых мономеров, так и на основе акриловых, метакриловых кислот и их производных – эфиров, амидов, нитрилов и др. Радикальная полимеризация является приоритетным способом синтеза

полимерных материалов благодаря ряду преимуществ: низкой себестоимости продукции, простоте реализации процесса, полимеризации с участием широкого круга мономеров¹. Решение сложных задач синтеза основывается на исследовании специфических физико-химических характеристик макромолекул² [4]. Изучение диэлектрических свойств высокомолекулярных соединений позволяет целенаправленно синтезировать или усовершенствовать полимеры с целью адаптации их к потребностям определенной отрасли промышленности² [4] и диапазону частот.

Анализ литературы показал, что до настоящего времени проведены работы по исследованию диэлектрических свойств широкого ряда полимеров при частотах, не превышающих 10 ГГц, а также в терагерцовом интервале частот [5–10]. Тем не менее детальные

¹ Handbook of radical polymerization / eds K. Matyjaszewski, T.P. Davis. Hoboken: Wiley-Interscience, 2002. 936 p.

² Сулягин В.М., Ляпков А.А. Физико-химические методы исследования полимеров: учеб. пособие. СПб.: Лань, 2022. 140 с.

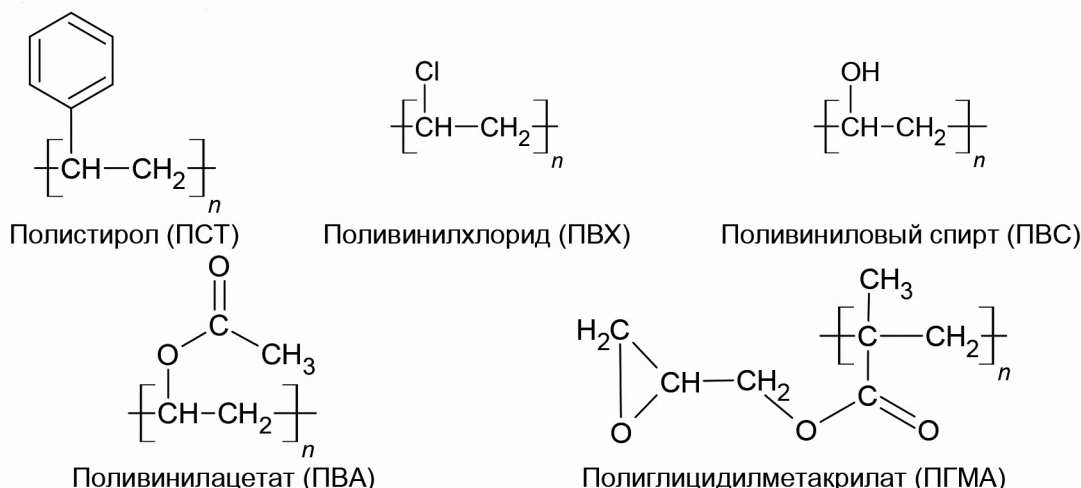


Рис. 1. Структурные формулы исследованных полимеров

Fig. 1. Structural formulas of the studied polymers

исследования характеристик ряда полимеров в промежуточном частотном диапазоне не проводились.

Целью данной работы являлось изучение диэлектрических свойств полимеров на основе виниловых мономеров – полистирола (ПСТ), поливинилхлорида (ПВХ), поливинилацетата (ПВА), поливинилового спирта (ПВС), полиглицидилметакрилата (ПГМА) – в диапазоне частот 100–200 ГГц, а также проведение сравнительного анализа с рядом исходных мономеров – стиролом (СТ), винилацетатом (ВА), глицидилметакрилатом (ГМА). Структурные формулы полимеров представлены на рис. 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Органические растворители очищали по известным методикам [11]. СТ, ГМА очищали от стабилизатора (гидрохинона) многократным промыванием 10%-м водным раствором гидроксида натрия до обесцвечивания водной фазы. Затем промывали водой до нейтральной реакции индикатора. Сушили над прокаленным хлоридом кальция, затем над гидридом кальция. Далее мономеры очищали вакуумной перегонкой, собирая фракции с соответствующей температурой кипения при необходимом давлении [12]. ВА сушили над гидридом кальция и перегоняли при атмосферном давлении. Физико-химические константы очищенных мономеров соответствовали стандартным параметрам, приведенным в источнике [12]. Динитрил азобисизомасляной кислоты (ДАК) использовали в качестве инициатора. Он представлял собой коммерческий продукт, который очищали перекристаллизацией из этанола по стандартной методике [13].

Для синтеза полимеров в ампулы помещали по 2 мл раствора мономера (СТ, ВА, ГМА) и 1 мол.% инициатора ДАК. При пониженном давлении ампулу трижды дегазировали путем повторения циклов замораживания – размораживания до остаточного давления 2×10^{-2} мм рт. ст. и отпаивали. Ампулы выдерживали в термостате при температуре 70 °С (± 1 °С) (ПСТ – 8 ч, ПВА – 1 ч,

ПГМА – 0,2 ч). По истечении определенного времени ампулу вынимали и замораживали в жидком азоте для прерывания полимеризации. С целью очистки полимеров от остатков мономера образцы были растворены в хлористом метиле и в случае с ПСТ высажены в изопропиловый спирт, в случае с ПВА, ПГМА – в петролейный эфир. Затем при пониженном давлении и температуре 50 °С сушили до постоянной массы. Исследованный в работе ПВХ – коммерческий продукт марки ПВХ 267-RC. ПВС – коммерческий продукт марки ПВС 16/1, соответствующий ГОСТ 10779-78³. Молекулярно-массовые характеристики полимеров определяли методом гель-проникающей хроматографии на хроматографе KNAUER (Knauer, Германия), снабженном каскадом колонок Phenomenex (300×7,8 мм, фенгель, 10 мкм) с диаметром пор 105 и 103 Å и двумя детекторами (рефрактометрическим и ультрафиолетовым). Элюентом служил тетрагидрофуран, температура колонки составляла $25,0 \pm 0,1$ °С. Для калибровки применяли узкодисперсные стандарты ПСТ и полиметилметакрилата [14]. Синтезированные образцы полимеров перед измерениями были просеяны через сито с размером ячеек 400 мкм.

Для исследования диэлектрических свойств материалов использовался резонаторный спектрометр [15–17].

Порошкообразный полимер насыпался на плоское зеркало диаметром 40 мм с ограничительным кольцом. Общая толщина порошка не превышала 1,5 мм. Методика измерения порошков с помощью резонатора Фабри – Перо описана в работе [18]. Фотография резонатора с полимерным образцом представлена на рис. 2, а.

Для исследования СТ, ВА, ГМА также использовали резонаторный спектрометр [19] и модифицированный метод измерений для исследования агрессивных жидкостей. Жидкость заливалась в герметизированную кювету (рис. 2, б), образованную плоским зеркалом резонатора с одной стороны и плоскопараллельной

³ ГОСТ 10779-78. Спирт поливиниловый. Технические условия. М.: Издательство стандартов, 1987. 24 с.

пластиной, изготовленной из радиационно модифицированного тефлона (Арфлона), с другой.

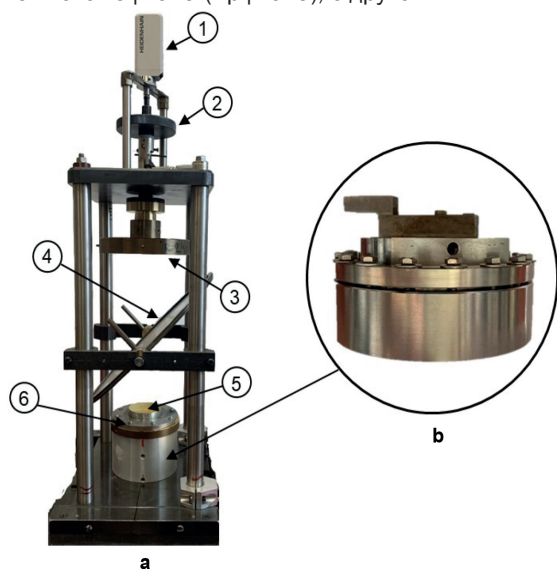


Рис. 2. Используемое оборудование: а – резонатор с полимерным образцом (1 – цифровой индикатор перемещения зеркала, сферическое зеркало, 2 – устройство перемещения зеркала, 3 – верхнее зеркало, 4 – пленка связи резонатора с источником сигнала и детектором, 5 – полимерный образец, 6 – подставка); б – кювета для исследования жидких образцов

Fig. 2. Equipment: a – resonator with a polymer sample (1 – digital indicator of mirror movement, spherical mirror, 2 – mirror moving device, 3 – top mirror, 4 – film for coupling the resonator with the radiation source and detector system, 5 – polymer sample, 6 – stand); b – photograph of a cuvette for studying liquid samples

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведено исследование полимеров на основе виниловых мономеров, синтезированных в присутствии радикального инициатора ДАК (ПСТ, ПВА, ПГМА), а также коммерческих продуктов (ПВХ, ПВС). В табл. 1 приведены результаты исследования диэлектрических свойств полимеров при частотах 100 и 200 ГГц.

Зависимость $\text{tg}\delta$ от частоты для всех исследуемых полимеров имеет квазилинейный характер, причем с увеличением частоты поглощающая способность полимеров увеличивается. Частотные зависимости $\text{tg}\delta$

представлены на рис. 3. Среди исследованных полимеров ПГМА, содержащий в своем составе эпоксидную группу, обладает наибольшей поглощающей способностью. Поглощающие свойства PST, синтезированного в условиях радикального иницирования, менее выражены, $\text{tg}\delta$ при 200 ГГц составляет 0,0068.

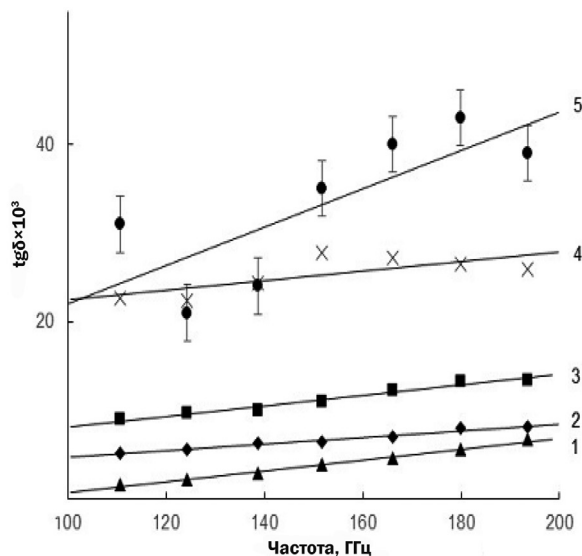


Рис. 3. Зависимость $\text{tg}\delta$ полимера от частоты: 1 – полистирол; 2 – поливинилхлорид; 3 – поливинилацетат; 4 – поливиниловый спирт; 5 – полиглицидилметакрилат

Fig. 3. Relationship between the polymer $\text{tan}\delta$ and frequency: 1 – polystyrene; 2 – polyvinyl chloride; 3 – polyvinyl acetate; 4 – polyvinyl alcohol; 5 – polyglycidyl methacrylate

Параллельно с целью выявления характерных особенностей проведены исследования диэлектрических свойств мономеров СТ, ВА и ГМА. Показано, что в исследуемом диапазоне частот межмолекулярные взаимодействия в PST имеют не столь решающее значение для поглощения в полимере (табл. 1, 2, рис. 4), то есть разница в поглощении мономера и полимера незначительна. Также в работе [6] было показано, что СТ и PST имеют схожие частотные зависимости коэффициента поглощения. Совершенно иная картина наблюдается в случае исходного мономера ВА и ПВА (табл. 1, 2). Мономер ВА как полярный диэлектрик обладает более выраженными поглощающими свойствами, в то время как в макромолекуле ПВА за счет межмолекулярных взаимодействий поглощение значительно снижается. Аналогичные закономерности наблюдаются и в случае ГМА и ПГМА (см. табл. 1, 2).

Таблица 1. Характеристики исследуемых полимеров

Table 1. Characteristics of the studied polymers

Полимер	n	$\text{tg}\delta \times 10^3$ (100 ГГц)	$\text{tg}\delta \times 10^3$ (200 ГГц)	$M_w \times 10^{-3}$, г/моль
Полистирол	1,09	0,6	6,8	225,0
Поливинилхлорид	1,26	4,6	8,4	145,2
Поливинилацетат	1,21	8,1	14,0	112,9
Поливиниловый спирт	1,33	22,0	28,0	–
Полиглицидилметакрилат	1,39	22,0	43,0	85,9

Таблица 2. Характеристики мономеров

Table 2. Characteristics of monomers

Мономер	n	$\text{tg}\delta \times 10^3$ (115 ГГц)	$\text{tg}\delta \times 10^3$ (196 ГГц)
Стирол	1,48	6,30	7,60
Глицидилметакрилат	1,70	100	150
Винилацетат	1,50	420	300

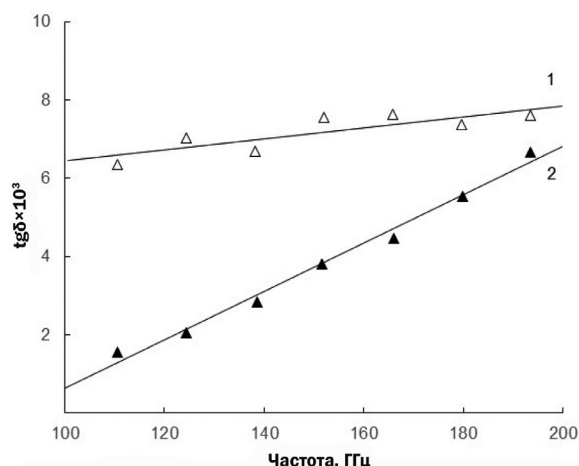


Рис. 4. Зависимость $\text{tg}\delta$ от частоты: 1 – стирол; 2 – полистирол

Fig. 4. Relationship between $\text{tan}\delta$ and frequency: 1 – styrene; 2 – polystyrene

Полученные данные о диэлектрических свойствах мономеров винилового ряда и полимеров представляют практический интерес при разработке подходов к получению полимерных материалов с заданными характеристиками методом радикальной полимеризации и развитию методов микроволнового синтеза полимеров [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На базе открытого высокочастотного резонатора Фабри – Перо исследованы диэлектрические параметры полимеров (показателя преломления и величин $\text{tg}\delta$) в диапазоне частот 100–200 ГГц. Проведен сравнительный анализ поглощающей способности полимеров при комнатной температуре. Выявлены полимеры, имеющие наименьшее поглощение. Наряду с этим анализированы исходные мономеры – СТ, ВА и ГМА. Показано, что полярные мономеры обладают большей поглощающей способностью по сравнению с неполярными.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Braun D., Cherdron H., Rehahn M., Ritter H., Voit B. Polymer synthesis: theory and practice. Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. 404 p. DOI: 10.1007/978-3-642-28980-4.
- Jiang L., Huang W., Xue X., Yang H., Jiang B., Zhang D., et al. Radical polymerization in the presence of chain transfer monomer: an approach to branched vinyl polymers // *Macromolecules*. 2012. Vol. 45, no. 10. P. 4092–4100. DOI: 10.1021/ma300443g.
- Shameem M.M., Sasikanth S.M., Annamalai R., Ganapathi Raman R. A brief review on polymer nanocomposites and its applications // *Materials Today: Proceedings*. 2021. Vol. 45. P. 2536–2539. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.11.254.
- Лебедева О.В., Сипкина Е.И. Полимерные композиты и их свойства // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2022. Т. 12. N 2. С. 192–207. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-2-192-207. EDN: BSBTTQ.
- Wietzke S., Jansen C., Jung T., Reuter M., Baudrit B., Bastian M., et al. Terahertz time-domain spectroscopy as a tool to monitor the glass transition in polymers // *Opt Express*. 2009. Vol. 17, no. 21. P. 19006–19014. DOI: 10.1364/OE.17.019006.
- Fedulova E.V., Nazarov M.M., Angeluts A.A., Kitai M.S., Sokolov V.I., Shkurinov A.P. Studying of dielectric properties of polymers in the terahertz frequency range // *Saratov Fall Meeting 2011: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIII*. 2012. Vol. 8337. P. 833701. DOI: 10.1117/12.923855.
- Mumtaz M., Mahmood A., Khan S.D., Zia M.A., Ahmed M., Ahmad I. Investigation of dielectric properties of polymers and their discrimination using terahertz time-domain spectroscopy with principal component analysis // *Applied Spectroscopy*. 2017. Vol. 71, no. 3. P. 456–462. DOI: 10.1177/0003702816675361.
- D'Angelo F., Mics Z., Bonn M., Turchinovich D. Ultra-broadband THz time-domain spectroscopy of common polymers using THz air photonics // *Opt Express*. 2014. Vol. 22, no. 10. P. 12475–12485. DOI: 10.1364/OE.22.012475.
- Farman N., Mumtaz M., Mahmood M.A., Khan S.D., Zia M.A., Raffi M., et al. Investigation of optical and dielectric properties of polyvinyl chloride and polystyrene blends in terahertz regime // *Optical Materials*. 2020. Vol. 99. P. 109534. DOI: 10.1016/j.optmat.2019.109534.
- Sahin S., Nahar N.K., Sertel, K. Dielectric properties of low-loss polymers for mmW and THz applications // *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*. 2019. Vol. 40. P. 557–573. DOI: 10.1007/s10762-019-00584-2.
- Вайсбергер А., Проскауэр Э., Риддик Дж., Тупс Э. Органические растворители. Физические свойства и методы очистки / пер. с англ. М.: Издательство иностранной литературы, 1958. 519 с.
- Мономеры: сб. ст. / под ред. В.В. Коршака. Ч. 2. М.: Иностранная литература, 1953. 270 с.
- Emmons W.D. The preparations and properties of oxaziranes // *Journal of the American Chemical Society*. 1957. Vol. 79, no. 21. P. 5739–5744. DOI: 10.1021/ja01578a043.
- Беленький Б.Г., Виленчик Л.З. Хроматография полимеров. М.: Химия, 1978. 345 с.
- Паршин В.В., Третьяков М.Ю., Кошелев М.А., Серов Е.А. Аппаратурный комплекс и результаты прецизионных исследований распространения

миллиметровых и субмиллиметровых волн в конденсированных средах и атмосфере // Известия вузов. Радиофизика. 2009. Т. 52. N 8. С. 583–594. EDN: JVKTVI.

16. Parshin V.V., Tretyakov M.Yu., Koshelev M.A., Serov E.A. Modern resonator spectroscopy at submillimeter wavelengths // *IEEE Sensors Journal*. 2013. Vol. 13, no. 1. P. 18–23. DOI: 10.1109/JSEN.2012.2215315.

17. Власов С.Н., Копосова Е.В., Мазур А.Б., Паршин В.В. Об измерении диэлектрической проницаемости резонансным методом // Известия вузов. Радиофизика. 1996. Т. 39. N 5. С. 615.

18. Parshin V.V., Serov E.A., Vodopyanov A.V., Mansfeld D.A. Method to measure the dielectric parameters

of powders in subterahertz and terahertz ranges // *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology*. 2021. Vol. 11, no. 4. P. 375–380. DOI: 10.1109/TTHZ.2021.3076698.

19. Паршин В.В., Серов Е.А. Резонансный метод исследования диэлектрических жидкостей в миллиметровом и субмиллиметровом диапазонах длин волн // Известия вузов. Радиофизика. 2011. Т. 54. N 8-9. С. 701–707. EDN: OKXUWZ.

20. Зеленцова Н.В., Зеленцов С.В., Кузнецов М.В. Инициирование полимеризации виниловых мономеров микроволновым излучением малой интенсивности // *Высокомолекулярные соединения. Серия Б*. 2002. Т. 44. N 9. С. 1595–1597. EDN: QMKNAА.

REFERENCES

1. Braun D., Cherdrone H., Rehahn M., Ritter H., Voit B. *Polymer synthesis: theory and practice*. Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag; 2013, 404 p. DOI: 10.1007/978-3-642-28980-4.

2. Jiang L., Huang W., Xue X., Yang H., Jiang B., Zhang D., et al. Radical polymerization in the presence of chain transfer monomer: an approach to branched vinyl polymers. *Macromolecules*. 2012;45(10):4092–4100. DOI: 10.1021/ma300443g.

3. Shameem M.M., Sasikanth S.M., Annamalai R., Ganapathi Raman R. A brief review on polymer nanocomposites and its applications. *Materials Today: Proceedings*. 2021;45:2536–2539. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.11.254.

4. Lebedeva O.V., Sipkina E.I. Polymer composites and their properties. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(2):192–207. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-2-192-207. EDN: BSBTTQ.

5. Wietzke S., Jansen C., Jung T., Reuter M., Baudrit B., Bastian M., et al. Terahertz time-domain spectroscopy as a tool to monitor the glass transition in polymers. *Opt Express*. 2009;17(21):19006–19014. DOI: 10.1364/OE.17.019006.

6. Fedulova E.V., Nazarov M.M., Angeluts A.A., Kitai M.S., Sokolov V.I., Shkurinov A.P. Studying of dielectric properties of polymers in the terahertz frequency range. *Saratov Fall Meeting 2011: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIII*. 2012;8337:833701. DOI: 10.1117/12.923855.

7. Mumtaz M., Mahmood A., Khan S.D., Zia M.A., Ahmed M., Ahmad I. Investigation of dielectric properties of polymers and their discrimination using terahertz time-domain spectroscopy with principal component analysis. *Applied Spectroscopy*. 2017;71(3):456–462. DOI: 10.1177/0003702816675361.

8. D'Angelo F., Mics Z., Bonn M., Turchinovich D. Ultra-broadband THz time-domain spectroscopy of common polymers using THz air photonics. *Opt Express*. 2014;22(10):12475–12485. DOI: 10.1364/OE.22.012475.

9. Farman N., Mumtaz M., Mahmood M.A., Khan S.D., Zia M.A., Raffi M., et al. Investigation of optical and dielectric properties of polyvinyl chloride and polystyrene blends in terahertz regime. *Optical Materials*. 2020;99:109534. DOI: 10.1016/j.optmat.2019.109534.

10. Sahin S., Nahar N.K., Sertel, K. Dielectric properties of low-loss polymers for mmW and THz applications. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*. 2019;40:557–573. DOI: 10.1007/s10762-019-00584-2.

11. Weissberger A., Proskauer E.S., Riddick J.A., Toops E.E. *Organic Solvents. Physical properties and methods of purification*. New York: Interscience Publishers; 1955, 552 p. (Russ. ed.: *Organicheskie rastvoriteli. Fizicheskie svoystva i metody ochistki*. Moscow: Izdatel'stvo inostrannoi literatury; 1958, 519 p.).

12. Korshak V.V. *Monomers*. Part 2. Moscow: Inostrannaya literatura; 1953, 270 p. (In Russian).

13. Emmons W.D. The preparations and properties of oxaziranes. *Journal of the American Chemical Society*. 1957;79(21):5739–5744. DOI: 10.1021/ja01578a043.

14. Belen'kii B.G., Vilenchik L.Z. *Chromatography of polymers*. Moscow: Khimiya; 1978, 345 p. (In Russian).

15. Parshin V.V., Tretyakov M.Yu., Koshelev M.A., Serov E.A. Instrumental complex and the results of precise measurements of millimeter- and submillimeter-wave propagation in condensed media and the atmosphere. *Izvestiya vuzov. Radiofizika*. 2009;52(8):583–594. (In Russian). EDN: JVKTVI.

16. Parshin V.V., Tretyakov M.Yu., Koshelev M.A., Serov E.A. Modern resonator spectroscopy at submillimeter wavelengths. *IEEE Sensors Journal*. 2013;13(1):18–23. DOI: 10.1109/JSEN.2012.2215315.

17. Vlasov S.N., Kuposova E.V., Mazur A.B., Parshin V.V. On measuring dielectric permittivity by the resonance method. *Izvestiya vuzov. Radiofizika*. 1996;39(5):615. (In Russian).

18. Parshin V.V., Serov E.A., Vodopyanov A.V., Mansfeld D.A. Method to measure the dielectric parameters of powders in subterahertz and terahertz ranges. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology*. 2021;11(4):375–380. DOI: 10.1109/TTHZ.2021.3076698.

19. Parshin V.V., Serov E.A. Resonance method for studying dielectric liquids in millimeter and submillimeter ranges of wavelengths. *Izvestiya vuzov. Radiofizika*. 2011;54(8-9):701–707. (In Russian). EDN: OKXUWZ.

20. Zelentsova N.V., Zelentsov S.V., Kuznetsov M.V. Initiation of vinyl polymerization by low-intensity microwave radiation. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya B*. 2002;44(9):1595–1597. (In Russian). EDN: QMKNAА.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Алыева Алиса Биняминовна,

к.х.н., научный сотрудник,
Институт прикладной физики РАН,
603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46,
Российская Федерация,
a.alieva@ipfran.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3749-7738>

Ананичева Светлана Андреевна,

младший научный сотрудник,
Институт прикладной физики РАН,
603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46,
Российская Федерация,
аспирант,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
bulanova@ipfran.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4008-3328>

Крапивницкая Татьяна Олеговна,

ведущий инженер,
Институт прикладной физики РАН,
603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46,
Российская Федерация,
аспирант,
Уфимский государственный нефтяной
технический университет,
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,
Российская Федерация,
✉ kto@ipfran.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4020-7482>

Колякина Елена Валерьевна,

д.х.н., доцент, профессор,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
kelena@ichem.unn.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1275-1026>

Глявин Михаил Юрьевич,

д.ф.-м.н., заместитель директора учреждения
по научной работе, заведующий отделом
электронных приборов,
Институт прикладной физики РАН,
603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46,
Российская Федерация,
glyavin@ipfran.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7896-9212>

Паршин Владимир Владимирович,

старший научный сотрудник,
Институт прикладной физики РАН,
603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46,
Российская Федерация,
parsh@ipfran.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4334-7680>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Alisa B. Alyeva,

Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
Institute of Applied Physics RAS,
46, Ulyanov St., Nizhniy Novgorod, 603950,
Russian Federation,
a.alieva@ipfran.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3749-7738>

Svetlana A. Ananicheva,

Junior Researcher,
Institute of Applied Physics RAS,
46, Ulyanov St., Nizhniy Novgorod, 603950,
Russian Federation,
Postgraduate Student,
Lobachevsky State University
of Nizhniy Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhniy Novgorod, 603022,
Russian Federation,
bulanova@ipfran.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4008-3328>

Tatiana O. Krapivnitckaia,

Leading Engineer,
Institute of Applied Physics RAS,
46, Ulyanov St., Nizhniy Novgorod, 603950,
Russian Federation,
Postgraduate Student,
Ufa State Petroleum Technical University,
1, Kosmonavtov St., Ufa, 450064,
Russian Federation,
✉ kto@ipfran.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4020-7482>

Elena V. Kolyakina,

Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Professor,
Lobachevsky State University
of Nizhniy Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhniy Novgorod, 603022,
Russian Federation,
kelena@ichem.unn.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1275-1026>

Mikhail Yu. Glyavin,

Dr. Sci. (Physics and Mathematics),
Deputy Director for Scientific Efforts,
Head of the Electronic Devices Department,
Institute of Applied Physics RAS,
46, Ulyanov St., Nizhniy Novgorod, 603950,
Russian Federation,
glyavin@ipfran.ru
<https://orcid.org/0000-0002-7896-9212>

Vladimir V. Parshin,

Senior Researcher,
Institute of Applied Physics RAS,
46, Ulyanov St., Nizhniy Novgorod, 603950,
Russian Federation,
parsh@ipfran.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4334-7680>

Серов Евгений Александрович,
старший научный сотрудник,
Институт прикладной физики РАН,
603950, г. Нижний Новгород, ул. Ульянова, 46,
Российская Федерация,
serov@ipfran.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9662-4277>

Evgenii A. Serov,
Senior Researcher,
Institute of Applied Physics RAS,
46, Ulyanov St., Nizhniy Novgorod, 603950,
Russian Federation,
serov@ipfran.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9662-4277>

Вклад авторов

А.Б. Алыева – подготовка публикации.
С.А. Ананичева – обработка полученных данных.
Т.О. Крапивницкая – обсуждение результатов.
Е.В. Колякина – разработка концепции исследования.
М.Ю. Глявин – разработка концепции исследования.
В.В. Паршин – проведение измерений.
Е.А. Серов – осуществление расчетов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 13.10.2023.
Одобрена после рецензирования 18.04.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

Contribution of the authors

Alisa B. Alyeva – preparation of the publication.
Svetlana A. Ananicheva – data processing.
Tatiana O. Krapivnitckaia – results discussion.
Elena V. Kolyakina – research concept development.
Mikhail Yu. Glyavin – research concept development.
Vladimir V. Parshin – conducting experiments.
Evgenii A. Serov – calculations.

Conflict interests

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

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

Information about the article

The article was submitted 13.10.2023.
Approved after reviewing 18.04.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.



Синтез, строение и биологическая активность моно- и бис-1-алкокси-4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-2-бутен-2-олятов натрия, цинка и магния

Е.А. Кунавина✉, А.Н. Сизенцов, А.М. Брежнев, Д.С. Воронкова

Оренбургский государственный университет, Оренбург, Российская Федерация

Аннотация. Поиск новых биологически активных соединений является ключевым направлением химической науки, в связи с чем представляется актуальным синтез соединений с потенциально возможным бактерицидным действием. С целью расширения рядов биологически активных веществ конденсацией Клайзена эквимольных количеств 2-ацетонафтона и диалкилоксалатов в неполярной среде в присутствии натрия в качестве конденсирующего агента осуществлен синтез 4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-1-этокси-2-бутен-2-олята натрия и 1-бутокс-4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-2-бутен-2-олята натрия. Реакцией металлообмена натриевых оксоенолятов с солями Zn(II) и Mg(II) получены бидентатные моноядерные металлохелаты. Строение синтезированных соединений подтверждено методами инфракрасной спектроскопии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса (^1H , ^{13}C) и масс-спектрометрии. В инфракрасных спектрах твердых образцов оксоенолятов натрия и металлокомплексов присутствуют полосы валентных колебаний сложноэфирных карбонильных групп, скелетных колебаний ароматических колец, а также «эфирные» полосы, обусловленные колебанием связей C–O–C. Спектры ядерного магнитного резонанса ^1H и ^{13}C , записанные в CDCl_3 и DMCO-d_6 , характеризуются полным набором всех ожидаемых сигналов с хорошо сопоставимыми со справочными данными значениями химических сдвигов. В масс-спектрах анализируемых соединений, зарегистрированных в растворе ацетонитрила в режиме электрораспыления, наблюдаются сигналы протонированных и катионированных молекул $[\text{M}+\text{H}]^+$ и $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Оценка бактерицидного действия синтезированных препаратов проводили с использованием диффузионного метода агаровых лунок в комбинации с методом серийных разведений. Выявлена биологическая активность 4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-1-этокси-2-бутен-2-олята натрия по отношению к *Pseudomonas Aeruginosa* и *Staphylococcus Aureus* и 1-бутокс-4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-2-бутен-2-олята натрия по отношению к *Pseudomonas Aeruginosa*. Установлена выраженная резистентность *Salmonella spp.* к исследуемым соединениям.

Ключевые слова: оксоеноляты натрия, металлокомплексы, органический синтез, поликарбонильные соединения, конденсация Клайзена, антимикробная активность

Для цитирования: Кунавина Е.А., Сизенцов А.Н., Брежнев А.М., Воронкова Д.С. Синтез, строение и биологическая активность моно- и бис-1-алкокси-4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-2-бутен-2-олятов натрия, цинка и магния // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 330–338. DOI: 10.21285/achb.928. EDN: ZXSSHJ.

CHEMICAL SCIENCES

Original article

Synthesis, structure, and biological activity of sodium, zinc, and magnesium mono- and bis-1-alkoxy-4-(2'-naphthyl)-1,4-dioxo-2-buten-2-olates

Elena A. Kunavina✉, Alexey N. Sizentsov, Andrey M. Brezhnev, Daria S. Voronkova

Orenburg State University, Orenburg, Russian Federation

Abstract. The search for new biologically active compounds is a key area of chemical science. Therefore, the synthesis of compounds with a potentially bactericidal effect seems relevant. In order to extend the range of biologically active substances, the synthesis of sodium 4-(2'-naphthyl)-1,4-dioxo-1-ethoxy-2-buten-2-olate and sodium

1-butoxy-4-(2'-naphthyl)-1,4-dioxo-2-buten-2-olate was carried out by Claisen condensation of equimolar amounts of 2-acetonaphthone and dialkyl oxalates in a non-polar medium in the presence of sodium as a condensing agent. Bidentate mononuclear metal chelates were obtained by the metal exchange reaction of sodium oxoenolates with Zn(II) and Mg(II) salts. The structure of the synthesized compounds was confirmed by infrared spectroscopy, (^1H , ^{13}C) nuclear magnetic resonance spectroscopy, and mass spectrometry. The infrared spectra of solid samples of sodium oxoenolates and metal complexes contain bands of stretching vibrations of ester carbonyl groups, skeletal vibrations of aromatic rings, as well as "ether" bands due to vibrations of C–O–C bonds. The ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra recorded in CDCl_3 and Dimethyl sulfoxide- d_6 are characterized by a complete set of all expected signals with chemical shift values that are well comparable with the reference data. In the mass spectra of the analyzed compounds, recorded in an acetonitrile solution in the electrospray mode, signals of $[\text{M}+\text{H}]^+$ and $[\text{M}+\text{Na}]^+$ protonated and cationized molecules are observed. The bactericidal action of the synthesized preparations was assessed using the agar well diffusion method in combination with the serial dilution method. The biological activity of sodium 4-(2'-naphthyl)-1,4-dioxo-1-ethoxy-2-buten-2-olate against *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus*, as well as sodium 1-butoxy-4-(2'-naphthyl)-1,4-dioxo-2-buten-2-olate against *Pseudomonas Aeruginosa*, was revealed. Pronounced resistance of *Salmonella* spp. to the studied compounds was established.

Keywords: sodium oxoenolates, metal complexes, organic synthesis, polycarbonyl compounds, Claisen condensation, antimicrobial activity

For citation: Kunavina E.A., Sizentsov A.N., Brezhnev A.M., Voronkova D.S. Synthesis, structure, and biological activity of sodium, zinc, and magnesium mono- and bis-1-alkoxy-4-(2'-naphthyl)-1,4-dioxo-2-buten-2-olates. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):330-338. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.928. EDN: ZXSSHJ.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из ключевых направлений органического синтеза выступает создание новых биологически активных соединений. Среди них особое место занимают металлокомплексные соединения, практическая значимость которых обусловлена возможностью применения их в медицине для изготовления фармацевтических препаратов [1–19]. В то же время в современном мире сохраняется тенденция к повышению устойчивости бактериальных штаммов к известным антибиотикам, что обуславливает актуальность поиска веществ с широким спектром биологического действия. Перспективными в силу многофункциональности и практикоориентированного использования являются металлокомплексы с органическими лигандами на основе поликарбонильных систем с сопряженными α - и β -диоксозвеньями, литературные сведения о которых весьма фрагментарны [1, 2, 13, 18, 20–22].

С целью получения веществ, обладающих биологической активностью, нами осуществлен синтез новых оксоенолятов натрия и металлопроизводных на их основе, а также проведены лабораторные испытания по выявлению их противомикробного действия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Инфракрасные (ИК) спектры полученных соединений записаны на ИК-Фурье спектрометре Vertex 70 (Bruker, Германия); приставка нарушенного полного внутреннего отражения, алмазный кристалл. Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ^1H соединений **1a**, **1b**, **2a** в CDCl_3 , соединения **2b** в $\text{DMSO}-d_6$ и спектры ЯМР ^{13}C соединения **2a** в CDCl_3 , соединения **2b** в $\text{DMSO}-d_6$ получены на ЯМР Фурье-спектрометре Bruker Avance II (Bruker, Германия, 400 МГц), внутренний стандарт –тетраметилсилан. Данные элементного анализа синтезированных соединений соответствуют расчетным значениям. Масс-спектры синтезированных соединений записаны на квадрупольно-времетраплетном масс-спектрометре сверхвысокого разрешения Orbitrap Elite, MicroToF Bruker Daltonics (Bruker Daltonics, Германия) в режиме элек-

трораспылительной ионизации. Протекание реакций контролировали, а индивидуальность полученных веществ подтверждали методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol UV-254 (Kavalier, Чехия) в системе бензол – диэтиловый эфир – гексан (1:2:3). Хроматограммы проявляли парами йода. Исходные реактивы перед использованием очищали перегонкой.

Синтез 1-алкокси-4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-2-бутен-2-олятов натрия (**1**). Общая методика. К смеси 25 ммоль (4,26 г) 2-ацетонафтона, 25 ммоль соответствующих диалкилоксалатов (диэтилоксалата и дибутилоксалата) и 50–70 мл толуола (растворитель перед использованием перегоняли) добавляли при перемешивании небольшими частями 0,58 г (25 ммоль) натрия. Смесь реагентов оставляли в колбе с воздушным холодильником на 2–4 часа. Растворитель испаряли, полученные натриевые еноляты промывали эфиром. Получали целевые оксоеноляты натрия **1a** и **1b**.

4-(2'-Нафтил)-1,4-диоксо-1-этокси-2-бутен-2-олят натрия (**1a**). Выход 7,21 г, 98%. Т.пл. 149–151 (разл.) °С. ИК-спектр, ν , cm^{-1} (тв.): 3057 $\nu(\text{C}-\text{H}, \text{Ar})$, 2976 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 2928 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, 1705 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1614 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}})$, 1570 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}})$, 1510 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}})$, 1364 $\delta(\text{CH}_3)$, 957 $\delta(\text{CH}_2)$, 777 $\delta(\text{CH}_{\text{Ar}})$. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д. (CDCl_3): 1,36 т (3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, J 7,2 Гц), 4,34 кв (2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, J 7,3 Гц), 6,77 с (1H, C^3H), 7,55 м (2H, C^6H и C^7H в C_{10}H_7), 7,87 д (3H, $\text{C}^3\text{H}, \text{C}^4\text{H}$ и C^8H в C_{10}H_7), 7,95 д (1H, C^5H в C_{10}H_7 , J 8,6 Гц), 8,45 с (1H, C^1H в C_{10}H_7). Найдено: m/z 293,0786 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено для $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{Na}^+$: 293,0784.

1-Бутокси-4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-2-бутен-2-олят натрия (**1b**). Выход 7,83 г, 97%. Т.пл. 110–112 (разл.) °С. ИК-спектр, ν , cm^{-1} (тв.): 3057 $\nu(\text{C}-\text{H}, \text{Ar})$, 2958 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 2872 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 1683 $\nu(\text{C}^{(1)}=\text{O})$, 1616 $\nu(\text{C}^{(4)}=\text{O})$, $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}})$, 1570, 1510, 1489 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}})$, 1384 $\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, 1249 $\delta_{\text{s}} \text{ крутильн}(\text{CH}_2)$, 1190 $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, 862, 817, 777, 758 $\delta(\text{CH}, \text{Ar})$. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д. (CDCl_3): 0,94 т (3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, J 7,4 Гц), 1,40 м (2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,71 м (2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4,28 т (2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, J 6,8 Гц), 6,84 с (1H, C^3H), 7,56 м (2H, C^6H и C^7H в C_{10}H_7), 7,90 д (3H, $\text{C}^3\text{H}, \text{C}^4\text{H}$ и

^8H в C_{10}H_7), 8,02 д (1H, ^5H в C_{10}H_7 , J 8,6 Гц), 8,45 с (1H, ^1H в C_{10}H_7). Найдено: m/z 321,1095 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 343,0910 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{Na}^+$: 321,1097, для $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{Na}_2^+$: 343,0917.

Синтез бис-(1-алкокси-4-(2'-нафтил)-1-оксо-2,4-бутандионато)металлов(II) (**2**). Общая методика. К раствору 6,0 ммоль натриевого оксоенолята в 50–100 мл воды добавляли при перемешивании раствор 3,0 ммоль сульфата цинка (для синтеза соединения **2a**) или магния (для синтеза соединения **2b**) в 10 мл воды. Через 30 минут выпавший осадок отфильтровывали на воронке Шотта, высушивали на воздухе. Полученные металлохелаты **2a**, **2b** перекристаллизовывали из этилацетата. Получали целевые бис-(4-(2'-нафтил)-1-оксо-1-этоксипутан-2,4-дионато)цинк и бис-(1-бутоксипутан-2,4-дионато)магний.

Бис-(4-(2'-нафтил)-1-оксо-1-этоксипутан-2,4-дионато)цинк (**2a**). Выход 0,8 г, 44%. Т.пл. 114–115 °С. ИК-спектр, ν , см^{-1} (тв.): 1717 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1587 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}})$, 1568 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}})$, 1520 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}})$, 1387 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, 1423 $\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 1362 $\delta(\text{CH}_3)$, 957 $\delta(\text{CH}_2)$, 777 $\delta(\text{CH}, \text{Ar})$, 756 $\delta(\text{CH}, \text{Ar})$. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д. (CDCl_3): 1,44 т (3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, J 7,4 Гц), 4,42 кв (2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, J 7,1 Гц), 6,84 с (1H, ^3H), 7,57 м (2H, ^6H и ^7H в C_{10}H_7), 7,92 д (3H, ^3H , ^4H и ^8H в C_{10}H_7), 8,03 д (1H, ^5H в C_{10}H_7 , J 9,0 Гц), 8,46 с (1H, ^1H в C_{10}H_7). Спектр ЯМР ^{13}C с полным подавлением ССВ с протонами, δ , м.д. (CDCl_3): 14,1 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 62,7 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 98,2 (^3H), 123,9 (^3H в C_{10}H_7), 126,7 (^7H в C_{10}H_7), 127,1 (^4H в C_{10}H_7), 127,7 (^5H в C_{10}H_7), 128,4 (^6H в C_{10}H_7), 130,2 (^8H в C_{10}H_7), 132,2 (^8H в C_{10}H_7), 132,5 (^1H в C_{10}H_7), 134,5 (^2H в C_{10}H_7), 135,6 (^4H в C_{10}H_7), 152,5 (C^2), 169,7 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 190,6 ($\text{C}^4=\text{O}$). Найдено: m/z 625,0812 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Вычислено для $\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{ZnNa}^+$: 625,0811.

Бис-(1-бутоксипутан-2,4-дионато)магний (**2b**). Выход: 1 г, 54%. Т.пл. 142–143 °С. ИК-спектр, ν , см^{-1} (тв.): 3060 $\nu(\text{C}-\text{H}, \text{Ar})$, 2956 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, 2870 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$, 1724 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1606, 1573, 1514, 1463 $\nu(\text{C}=\text{C}, \text{Ar})$, 1253 $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, 860, 819, 779, 756 $\delta(\text{CH}, \text{Ar})$. Спектр ЯМР ^1H , δ , м.д. ($\text{DMSO}-d_6$): 0,92 т (3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, J 7,4 Гц), 1,39 м (2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,66 м

(2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4,20 т (2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, J 6,5 Гц), 6,76 с (1H, ^3H), 7,58 м (2H, ^6H и ^7H в C_{10}H_7), 7,95 д (3H, ^3H , ^4H и ^8H в C_{10}H_7), 8,06 д (1H, ^5H в C_{10}H_7 , J 7,8 Гц), 8,48 с (1H, ^1H в C_{10}H_7). Спектр ЯМР ^{13}C с полным подавлением ССВ с протонами, δ , м.д. ($\text{DMSO}-d_6$): 5,1 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 16,6 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 25,9 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 50,9 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 80,7 (^3H), 110,4 (^3H в C_{10}H_7), 113,0 (^7H в C_{10}H_7), 113,8 (^4H в C_{10}H_7), 113,9 (^5H в C_{10}H_7), 114,0 (^6H в C_{10}H_7), 114,4 (^8H в C_{10}H_7), 115,6 (^1H в C_{10}H_7), 118,8 (^8H в C_{10}H_7), 120,7 (C^2 в C_{10}H_7), 123,4 (^4H в C_{10}H_7), 152,4 (C^2), 159,0 ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 172,9 ($\text{C}^4=\text{O}$). Найдено: m/z 619,2297 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вычислено для $\text{C}_{36}\text{H}_{35}\text{O}_8\text{Mg}^+$: 619,2277.

Методика определения антимикробной активности. Исследуемый микроорганизм высевали на стерильный питательный сухой агар на основе гидролизата рыбной муки сплошным «газоном» в объеме 100 мкл суспензии $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Пробочным сверлом (диаметром 5 мм) в толще агаризованной среды вырезали лунки в количестве 7 штук на одной чашке Петри (удаление от края чашки Петри 15 мм, расстояние между лунками 30 мм), в которые вносили исследуемые концентрации веществ в объеме 30 мкл для оценки их ингибирующего действия. Культуры бактериальных клеток инкубировали в течение 24 часов при температуре 37 °С с последующей визуальной оценкой влияния исследуемых веществ на рост и морфологию тест-организма. Степень резистентности бактериальных штаммов к исследуемому веществу определяли по ширине диаметрально удаленной задержки роста в миллиметрах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1-Алкокси-4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-2-бутен-2-оляты натрия синтезированы конденсацией 2-ацетонафтона с диалкилоксалатами в присутствии натрия в среде толуола при эквимолярном соотношении реагентов (рис. 1).

Физико-химические свойства полученных оксоенолятов натрия (**1a**, **1b**) приведены в табл. 1.

Реакцией металлообмена в водных растворах натриевых производных (**1a**, **1b**) с солями магния(II) и цинка(II) нами синтезированы металлохелатные комплексы (рис. 2).

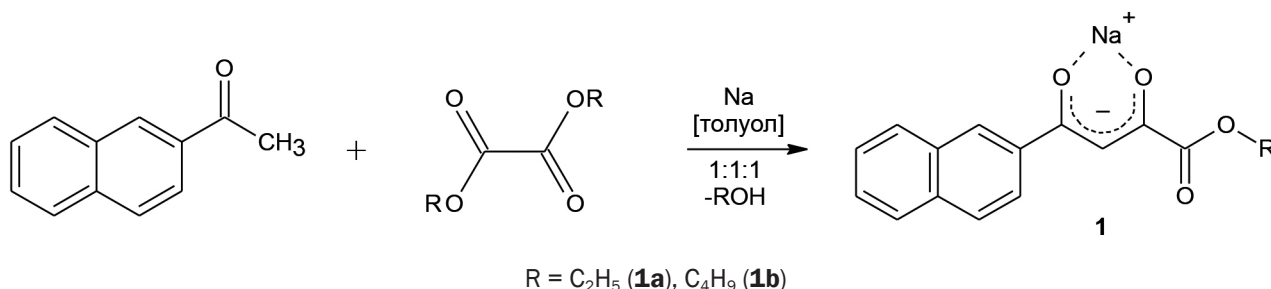


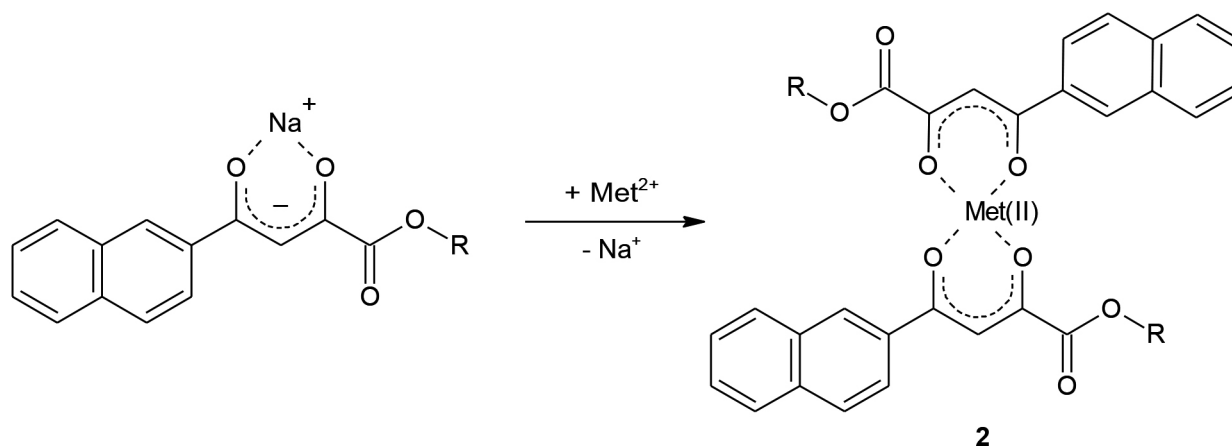
Рис. 1. Схема синтеза 1-алкокси-4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-2-бутен-2-олятов натрия (**1**)

Fig. 1. Scheme for the synthesis of sodium 1-alkoxy-4-(2'-naphthyl)-1,4-dioxo-2-butene-2-olates (**1**)

Таблица 1. Характеристики 1-алкокси-4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-2-бутен-2-олятов натрия (**1**)

Table 1. Characteristics of sodium 1-alkoxy-4-(2'-naphthyl)-1,4-dioxo-2-butene-2-olates (**1**)

Соединение	R	Брутто-формула	Молекулярная масса, г/моль	Т.пл., °С	Выход, %
1a	C_2H_5	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{Na}$	292	149–151 (разл.)	98
1b	C_4H_9	$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{Na}$	320	110–112 (разл.)	97



R = C₂H₅ (**1a**, **2a**), C₄H₉ (**1b**, **2b**), Met(II) = Zn (**2a**), Mg (**2b**)

Рис. 2. Схема синтеза бис-(1-алкокси-4-(2'-нафтил)-1-оксо-2,4-бутандионато)металлов(II) (**2**)

Fig. 2. Scheme for the synthesis of bis-(1-alkoxy-4-(2'-naphthyl)-1-oxo-2,4-butanedionato)metals(II) (**2**)

Таблица 2. Характеристики бис-(1-алкокси-4-(2'-нафтил)-1-оксо-2,4-бутандионато)металлов(II) (**2**)

Table 2. Characteristics of bis-(1-alkoxy-4-(2'-naphthyl)-1-oxo-2,4-butanedionato)metals(II) (**2**)

Соединение	R	Met(II)	Брутто-формула	Молекулярная масса, г/моль	Т.пл., °C	Выход, %
2a	C ₂ H ₅	Zn	C ₃₂ H ₂₆ O ₈ Zn	604	114–115	46
2b	C ₄ H ₉	Mg	C ₃₆ H ₃₄ O ₈ Mg	618	142–143	54

Физико-химические свойства металлохелатов (**2a**, **2b**) приведены в табл. 2.

Синтезированные соединения **1a** и **1b** представляют собой твердые вещества желтого цвета. Соединение **1a** хорошо растворимо в хлороформе и трудно растворимо в воде, этаноле, этилацетате, толуоле, диметилсульфоксиде (ДМСО). Соединение **1b** хорошо растворимо в этилацетате, хлороформе и диоксане и трудно растворимо в воде, этаноле, толуоле, ДМСО. Металлокомплекс **2a** представляет собой твердое вещество желто-оранжевого цвета. Металлокомплекс **2b** – твердое вещество бледно-желтого цвета. Соединения **2a** и **2b** не растворимы в воде и трудно растворимы в большинстве органических растворителей.

Строение полученных соединений подтверждено методами ИК, ЯМР ¹H, ¹³C спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения [22]. В ИК-спектрах твердых образцов натриевых енолятов **1a** и **1b** присутствуют полосы валентных колебаний сложноэфирной карбонильной группы в области 1683–1705 см⁻¹. В ИК-спектрах бис-(1-алкокси-4-(2'-нафтил)-1-оксо-2,4-бутандионато)металлов(II) **2a** и **2b**, записанных для образцов в твердом состоянии, имеются полосы поглощения валентных колебаний сложноэфирной карбонильной группы на частотах 1716–1724 см⁻¹. Колебания ароматических колец находятся в области 1463–1606 см⁻¹. Уширенная расщепленная эфирная полоса высокой интенсивности наблюдается при 1253–1278 см⁻¹.

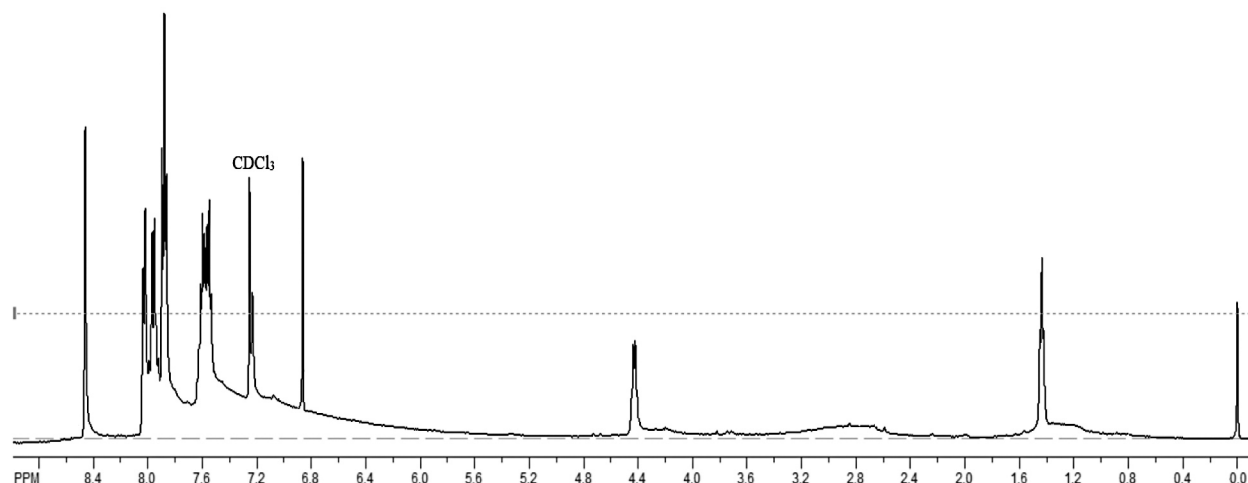


Рис. 3. Спектр ЯМР ¹H (δ, м.д., CDCl₃/тетраметилсилан) бис-(4-(2'-нафтил)-1-оксо-1-этоксипутан-2,4-дионато)цинка (**2a**)

Fig. 3. NMR spectrum of ¹H (δ, ppm, CDCl₃/TMS) bis-(4-(2'-naphthyl)-1-oxo-1-ethoxybutane-2,4-dionato)zinc (**2a**)

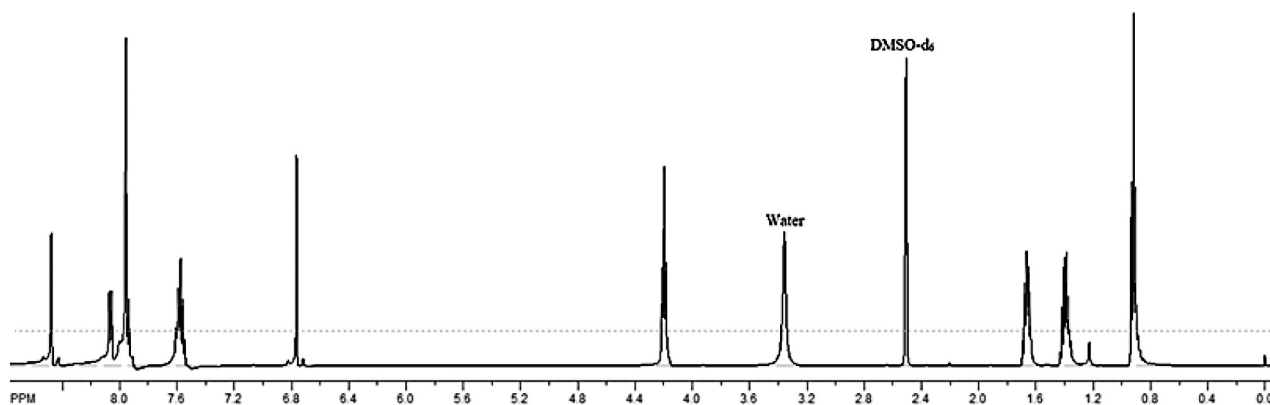


Рис. 4. Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., CDCl_3 /тетраметилсилан) бис-(1-бutoкси-4-(2'-нафтил)-1-оксobутан-2,4-дионато)магния (**2b**)

Fig. 4. NMR spectrum of ^1H (δ , ppm, CDCl_3 /TMS) bis-(1-butoxy-4-(2-naphthyl)-1-oxobutane-2,4-dionato)magnesium (**2b**)

В спектрах ЯМР ^1H оксоенолятов **1a** и **1b**, записанных в растворе дейтерохлороформа, присутствуют триплетные сигналы метильных групп алкокси-фрагментов при 0,94–1,36 м.д. ($J_{\text{HH}} = 7,2\text{--}7,4$ Гц). Квадруплетный сигнал метиленовой группы этоксифрагмента вещества **1a** наблюдается при 4,34 м.д. ($J_{\text{HH}} = 7,3$ Гц). Мультиплетные сигналы метиленовых групп бutoкси-фрагмента вещества **1b** зарегистрированы при 1,40 м.д. ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) и 1,71 м.д. ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), триплетный сигнал метиленовой группы ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) – при 4,28 м.д. ($J_{\text{HH}} = 6,8$ Гц). Протоны метиновых групп идентифицированы по синглетным сигналам в области 6,77–6,84 м.д. Мультиплетные, дублетные и синглетные сигналы ароматических протонов монозамещенного нафтильного фрагмента зарегистрированы при 7,55–8,45 м.д.

В спектрах ЯМР ^1H (рис. 3, 4) комплексов **2a** и **2b**, записанных в растворах дейтерохлороформа и $\text{DMSO}-d_6$ соответственно, присутствуют триплетные сигналы метильных групп алкокси-фрагментов при 0,92–1,44 м.д. ($J_{\text{HH}} = 7,4$ Гц). Квадруплетный сигнал метиленовой группы этоксифрагмента вещества **2a** зарегистрирован при 4,42 м.д. ($J_{\text{HH}} = 7,1$ Гц). Мультиплетные сигналы метиленовых групп бutoксифрагмента вещества **2b** наблюдаются при 1,39 м.д. ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) и 1,66 м.д. ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), триплетный сигнал метиленовой группы ($\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) – при 4,20 м.д. ($J_{\text{HH}} = 6,5$ Гц). Синглеты протонов метиновых групп находятся в области 6,76–6,84 м.д. Мультиплетные, дублетные и синглетные

сигналы ароматических протонов нафтильного фрагмента зарегистрированы при 7,57–8,48 м.д.

В спектрах ЯМР ^{13}C металлокомплексов **2a** и **2b**, снятых в растворах дейтерохлороформа и $\text{DMSO}-d_6$ соответственно, в слабopольной области присутствуют сигналы карбонильных атомов углерода: $\text{C}^{(2)}=\text{O}$ при 152,4–152,5 м.д., $\text{C}^{(3)}=\text{O}$ при 159,0–169,7 м.д. и $\text{C}^{(4)}=\text{O}$ при 172,9–190,6 м.д. Сигналы атомов углерода ароматических колец находятся при 110,4–135,6 м.д., наиболее дезэкранированными оказываются атомы, общие для двух циклов ($\text{C}^{4a'}\text{H}$ и $\text{C}^{8a'}\text{H}$ в C_{10}H_7), а также замещенный атом $\text{C}^{2'}$.

В масс-спектрах оксоенолятов **1a**, **1b** и металлокомплексов **2a**, **2b**, записанных в растворе ацетонитрила в режиме электрораспыления, наблюдаются сигналы протонированных и катионированных молекул $[\text{M}+\text{H}]^+$ и $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Прикладной составляющей данной работы явилось изучение противомикробной активности синтезированных соединений **1a** и **1b**. В качестве исследуемых микроорганизмов были выбраны следующие клинические изоляты бактериальных штаммов: *Staphylococcus aureus* – грамположительная кокковая форма микроорганизмов, является факультативным анаэробом, но лучше развивается в аэробных условиях, спор не образует, образует микрокапсулу; *Pseudomonas aeruginosa* – грамотрицательная аэробная палочка, обладает способностью образовывать капсулоподобную

Таблица 3. Результаты исследования биологической активности 1-алкокси-4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-2-бутен-2-олятов натрия (**1**)

Table 3. Biological activity of 1-alkoxy-4-(2-naphthyl)-1,4-dioxo-2-butene-2-sodium olates (**1**)

Исследуемые соединения	Концентрация, моль/л				
	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0063
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
1a	33,70±0,88	26,70±1,45*	21,30±0,88*	17,00±0,58*	–
1b	25,67±0,88	21,00±1,15*	16,00±1,00*	10,00±0,58**	–
<i>Staphylococcus aureus</i>					
1a	15,30±0,88	13,30±0,33	9,70±0,58*	–	–
1b	–	–	–	–	–
<i>Salmonella</i> spp.					
1a	–	–	–	–	–
1b	–	–	–	–	–

Примечание. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ (расчет t -критерия Стьюдента по отношению к предыдущему разведению).

оболочку, спор не образует, вызывает разнообразные гнойно-воспалительные заболевания; *Salmonella* spp. – граммотрицательная палочка, спор также не образует. Оценку бактерицидного действия проводили с использованием диффузионного метода агаровых лунок в комбинации с методом серийных разведений. Результаты исследования отражены в табл. 3.

Анализируя результаты проведенного эксперимента, можно отметить, что соединение **1a** обладает выраженным бактерицидным действием в отношении двух исследуемых тест-организмов – *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Минимальная концентрация, при которой наблюдается подавление роста *P. aeruginosa*, составила 0,0125 моль/л, *S. aureus* – 0,025 моль/л. По мере снижения уровня концентрации исследуемого соединения регистрируется ослабление ингибирующего действия на тест-организмы. В отношении *Salmonella* spp. изучаемое соединение не проявляет бактерицидного действия.

Соединение **1b** обладает выраженным бактерицидным действием в отношении только одного исследуемого тест-организма – *P. aeruginosa*. Минимальная ингибирующая рост концентрация для данного микроор-

ганизма составила 0,0125 моль/л. По мере снижения концентрации исследуемого соединения регистрируется снижение бактерицидных характеристик в отношении тест-организма. *S. aureus* и *Salmonella* spp. проявляют выраженную резистентность к соединению **1b**.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, конденсацией Клайзена 2-ацетонафта с диалкилоксалатами в присутствии конденсирующего реагента нами получены новые 1-алкокси-4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-2-бутен-2-оляты натрия. В ходе реакции металлообмена оксоенолятов натрия с ионами цинка и магния выделены для дальнейших прикладных исследований ранее не описанные бис-(1-алкокси-4-(2'-нафтил)-1-оксо-2,4-бутандионато)металлы(II). Структура синтезированных соединений подтверждена с использованием спектральных методов анализа. Выявлена биологическая активность 4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-1-этокси-2-бутен-2-олята натрия по отношению к *P. Aeruginosa* и *S. Aureus* и 1-бутоксид-4-(2'-нафтил)-1,4-диоксо-2-бутен-2-олята натрия по отношению к *P. Aeruginosa*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Maurin C., Bailly F., Cotel P. Improved preparation and structural investigation of 4-aryl-4-oxo-2-hydroxy-2-butenic acids and methyl esters // *Tetrahedron*. 2004. Vol. 60, no. 31. P. 6479–6486. DOI: 10.1016/j.tet.2004.06.030.
2. Пулина Н.А., Собин Ф.В., Краснова А.И. Поиск отечественных фармацевтических субстанций в ряду металлокомплексов на основе (гет)ариламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот // *Координационная химия*. 2023. Т. 49. N 10. С. 644–650. DOI: 10.31857/S0132344X23600182. EDN: TGGNTC.
3. Sajadiyeh E., Tabatabaee M., Seifati S.M., Derikvand Z. Cytotoxic effect of palladium(II) complex with 4-amino-5-methyl-2H-1,2,4-triazole-3(4H)-thione ligand on MCF-7 cell line // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020. Vol. 54, no. 2. P. 145–147. DOI: 10.1007/s11094-020-02171-5.
4. Baranov V.V., Vikrishchuk N.I., Zubenko A.A., Estrin I.A., Lipatov E.S., Svyatogorova A.E. Synthesis, structure, and biological activity of new metal carboxylate complexes containing a glycoluril fragment // *Russian Journal of General Chemistry*. 2023. Vol. 93, no. 4. P. 863–869. DOI: 10.1134/s1070363223040126.
5. Xue W., Fu X., Zhao G.-Q., Li Q.-B. Zinc(II) complexes derived from schiff bases: Syntheses, structures, and biological activity // *Acta Chimica Slovenica*. 2021. Vol. 68, no. 1. P. 17–24. DOI: 10.17344/acs.2020.5817.
6. Садовская Н.Ю., Глушко В.Н., Блохина Л.И., Ретивов В.М. Биологическая активность краун-эфиров и их металлокомплексов // *Химическая безопасность*. 2020. Т. 4. N 2. С. 80–100. DOI: 10.25514/CHS.2020.2.18006. EDN: TVTEAF.
7. Parshina L.N., Trofimov B.A. Metal complexes with N-alkenylimidazoles: synthesis, structures, and biological activity // *Russian Chemical Bulletin*. 2011. Vol. 6, no. 4. P. 601–614. DOI: 10.1007/s11172-011-0096-9.
8. Ramsis T.M., Ebrahim M.A., Fayed E.A. Synthetic coumarin derivatives with anticoagulation and antiplatelet aggregation inhibitory effects // *Medicinal Chemistry Research*. 2023. Vol. 32, no. 11. P. 2269–2278. DOI: 10.1007/s00044-023-03148-1.
9. Махмудов Р.Р., Никифорова Е.А., Зверев Д.П., Балукина Л.А., Скачков А.П. Синтез и антиноцицептивная активность 2,2'-(1,4-фенилен)бис[3-арил-2-азаспиро[3.5]нонан-1-онов] // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2023. Т. 13. N 4. С. 476–482. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-476-482. EDN: BXPEAR.
10. Deng C., Mi J., Zhou Y., Li X., Liu Z., Sang Z., et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 2-acetylphenol-rivastigmine hybrids as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease // *Medicinal Chemistry Research*. 2022. Vol. 31, no. 5. P. 1035–1048. DOI: 10.1007/s00044-022-02899-7.
11. Shamim S., Gul S., Khan A., Ahmed A., Gul A. Antimicrobial, antifungal and enzymatic profiling of newly synthesized heavy metal complexes of gemifloxacin // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022. Vol. 55, no. 10. P. 1033–1039. DOI: 10.1007/s11094-021-02534-6.
12. Ukhov S.V., Mikhalev A.I., Boyarshinov V.D., Novikova V.V. Synthesis, properties, and antimicrobial activity of N-aryl-7-hydroxy-2-imino-2H-chromene-3-carboxamides // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021. Vol. 54, no. 10. P. 1012–1014. DOI: 10.1007/s11094-021-02312-4.
13. Pulina N.A., Kuznetsov A.S., Krasnova A.I., Novikova V.V. Synthesis, antimicrobial activity, and behavioral response effects of N-substituted 4-aryl-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid hydrazides and their metal complexes // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019. Vol. 53, no. 3. P. 220–224. DOI: 10.1007/s11094-019-01983-4.
14. Ulular M., Sari N., Han F., Ögütçü H., Özkan E.H. Synthesis, antimicrobial, and DNA-binding evaluation of novel schiff bases containing tetrazole moiety and their Ni(II) and Pt(II) complexes // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2024. Vol. 57, no. 10. P. 1609–1620. DOI: 10.1007/s11094-024-03056-7.
15. Saroya S., Asija S., Deswal Y., Kumar N., Devi J. Synthesis, characterization, and *in vitro* antimicrobial and antioxidant study of the pentacoordinated organotin(IV) complexes based on acid hydrazide schiff base ligands // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2023. Vol. 57, no. 9. P. 1372–1383. DOI: 10.1007/s11094-023-03000-1.

16. Gulea A.P., Usataia I.S., Graur V.O., Tsapkov V.I., Chumakov Y.M., Petrenko P.A., et al. Synthesis, structure and biological activity of coordination compounds of copper, nickel, cobalt, and iron with ethyl N'-(2-hydroxybenzylidene)-N-prop-2-en-1-ylcarbamohydrazone-thioate // Russian Journal of General Chemistry. 2020. Vol. 90, no. 4. P. 630–639. DOI: 10.1134/S107036322004012X. EDN: GKJZZU.

17. Tkacheva A.R., Sharutin V.V., Sharutina O.K., Shlepotina N.M., Kolesnikov O.L., Shishkova Y.S., et al. Tetravalent platinum complexes: synthesis, structure, and antimicrobial activity // Russian Journal of General Chemistry. 2020. Vol. 90, no. 4. P. 655–659. DOI: 10.1134/S1070363220040155. EDN: AIUONV.

18. Gein V.L., Bobrovskaya O.V., Mashkina E.A., Novikova V.V., Hvolis E.A., Belonogova V.D., et al. Synthesis and antimicrobial activity of methyl (2Z)-4-aryl-2-[4-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfamoyl]phenylamino]-4-oxobut-2-enates and their silver salts // Russian Journal of General Chemistry. 2020. Vol. 90, no. 5. P. 822–826. DOI: 10.1134/S1070363220050102. EDN: LLVFFF.

19. Кустова Т.В., Данилова Е.А., Сеницын А.М. Комплексные соединения с марганцем на основе

производных 3,5-диамино-1,2,4-триазола. Синтез и перспективы применения // Жидкие кристаллы и их практическое использование. 2020. Т. 20. N 2. С. 35–44. DOI: 10.18083/LCApl.2020.2.35. EDN: OEZWGO.

20. Kunavina E.A., Sizentsov A.N., Salikova E.V., Rusyaeva M.L., Korol'kova D.S., Koz'minykh V.O. Synthesis, structure, and biological activity of magnesium(II), zinc(II), cobalt(II), and copper(II) bis(4-aryl-1-ethoxy-1-oxobutane-2,4-dionates) // Russian Journal of General Chemistry. 2019. Vol. 89, no. 1. P. 67–70. DOI: 10.1134/S1070363219010122.

21. Кунавина Е.А., Сизенцов А.Н., Левенец Т.В., Саликова Е.В., Королькова Д.С., Козьминых В.О. Синтез, строение и биологическая активность 4-арилзамещенных 1,4-диоксо-1-этокси-2-алкенолятов натрия // Башкирский химический журнал. 2018. Т. 25. N 3. С. 13–16. DOI: 10.17122/bcj-2018-3-13-16. EDN: YAQXQL.

22. Kawai H., Kitano Y., Mutoh M., Hata G. Synthesis, structure and antitumor activity of a new water-soluble platinum complex, (1R,2R-cyclohexanediamine-N,N') [2-hydroxy-4-oxo-2-pentenoato(2-)-O²] platinum(II) // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1993. Vol. 4, no. 2. P. 357–361. DOI: 10.1248/cpb.41.357.

REFERENCES

1. Maurin C., Bailly F., Cotel P. Improved preparation and structural investigation of 4-aryl-4-oxo-2-hydroxy-2-butenic acids and methyl esters. *Tetrahedron*. 2004;60(31):6479–6486. DOI: 10.1016/j.tet.2004.06.030.

2. Pulina N.A., Sobin F.V., Krasnova A.I. The search for domestic pharmaceutical substances among metal complexes based on (hetero)arylamides of 4-aryl-2-hydroxy-4-oxo-2-butenic acids. *Koordinatsionnaya khimiya*. 2023;49(10):644–650. (In Russian). DOI: 10.31857/S0132344X23600182. EDN: TGGNTC.

3. Sajadiyeh E., Tabatabaee M., Seifati S.M., Derikvand Z. Cytotoxic effect of palladium(II) complex with 4-amino-5-methyl-2H-1,2,4-triazole-3(4H)-thione ligand on MCF-7 cell line. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;54(2):145–147. DOI: 10.1007/s11094-020-02171-5.

4. Baranov V.V., Vikrishchuk N.I., Zubenko A.A., Estrin I.A., Lipatov E.S., Svyatogorova A.E. Synthesis, structure, and biological activity of new metal carboxylate complexes containing a glycoluril fragment. *Russian Journal of General Chemistry*. 2023;93(4):863–869. DOI: 10.1134/S1070363223040126.

5. Xue W., Fu X., Zhao G.-Q., Li Q.-B. Zinc(II) complexes derived from schiff bases: Syntheses, structures, and biological activity. *Acta Chimica Slovenica*. 2021;68(1):17–24. DOI: 10.17344/acs.2020.5817.

6. Sadvovskaya N.Yu., Glushko V.N., Blokhina L.I., Retivov V.M. Biological activity of crown ethers and their metal complexes. *Chemical Safety Science*. 2020;4(2):80–100. (In Russian). DOI: 10.25514/CHS.2020.2.18006. EDN: TVTEAF.

7. Parshina L.N., Trofimov B.A. Metal complexes with N-alkenylimidazoles: synthesis, structures, and biological activity. *Russian Chemical Bulletin*. 2011;6(4):601–614. DOI: 10.1007/s11172-011-0096-9.

8. Ramsis T.M., Ebrahim M.A., Fayed E.A. Synthetic coumarin derivatives with anticoagulation and antiplatelet aggregation inhibitory effects. *Medicinal Chemistry Research*. 2023;32(11):2269–2278. DOI: 10.1007/s00044-023-03148-1.

9. Makhmudov R.R., Nikiforova E.A., Zverev D.P., Baly-

ukina L.A., Skachkov A.P. Synthesis and antinociceptive activity of 2,2'-(1,4-phenylene)bis[3-aryl-2-azaspiro[3.5]nonan-1-ones]. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):476–482. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-476-482. EDN: BXPEAR.

10. Deng C., Mi J., Zhou Y., Li X., Liu Z., Sang Z., et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 2-acetylphenol-rivastigmine hybrids as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Medicinal Chemistry Research*. 2022;31(5):1035–1048. DOI: 10.1007/s00044-022-02899-7.

11. Shamim S., Gul S., Khan A., Ahmed A., Gul A. Antimicrobial, antifungal and enzymatic profiling of newly synthesized heavy metal complexes of gemifloxacin. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;55(10):1033–1039. DOI: 10.1007/s11094-021-02534-6.

12. Ukhov S.V., Mikhalev A.I., Boyarshinov V.D., Novikova V.V. Synthesis, properties, and antimicrobial activity of N-aryl-7-hydroxy-2-imino-2H-chromene-3-carboxamides. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;54(10):1012–1014. DOI: 10.1007/s11094-021-02312-4.

13. Pulina N.A., Kuznetsov A.S., Krasnova A.I., Novikova V.V. Synthesis, antimicrobial activity, and behavioral response effects of N-substituted 4-aryl-2-hydroxy-4-oxobut-2-enoic acid hydrazides and their metal complexes. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(3):220–224. DOI: 10.1007/s11094-019-01983-4.

14. Ulular M., Sari N., Han F., Ögütçü H., Özkan E.H. Synthesis, antimicrobial, and DNA-Binding evaluation of novel schiff bases containing tetrazole moiety and their Ni(II) and Pt(II) complexes. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2024;57(10):1609–1620. DOI: 10.1007/s11094-024-03056-7.

15. Saroya S., Asija S., Deswal Y., Kumar N., Devi J. Synthesis, characterization, and *in vitro* antimicrobial and antioxidant study of the pentacoordinated organotin(IV) complexes based on acid hydrazide schiff base ligands.

Pharmaceutical Chemistry Journal. 2023;57(9):1372-1383. DOI: 10.1007/s11094-023-03000-1.

16. Gulea A.P., Usataia I.S., Graur V.O., Tsapkov V.I., Chumakov Y.M., Petrenko P.A., et al. Synthesis, structure and biological activity of coordination compounds of copper, nickel, cobalt, and iron with ethyl N'-(2-hydroxybenzylidene)-N-prop-2-en-1-ylcarbamohydrazonothioate. *Russian Journal of General Chemistry*. 2020;90(4):630-639. DOI: 10.1134/S107036322004012X. EDN: GKJZZU.

17. Tkacheva A.R., Sharutin V.V., Sharutina O.K., Shlepotina N.M., Kolesnikov O.L., Shishkova Y.S., et al. Tetravalent platinum complexes: synthesis, structure, and antimicrobial activity. *Russian Journal of General Chemistry*. 2020;90(4):655-659. DOI: 10.1134/S1070363220040155. EDN: AIUONV.

18. Gein V.L., Bobrovskaya O.V., Mashkina E.A., Novikova V.V., Hvolis E.A., Belonogova V.D., et al. Synthesis and antimicrobial activity of methyl (2Z)-4-aryl-2-[4-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)sulfamoyl]phenylamino]-4-oxobut-2-enoates and their silver salts // *Russian Journal of General Chemistry*. 2020;90(5):822-826. DOI: 10.1134/S1070363220050102. EDN: LLVFFF.

19. Kustova T.V., Danilova E.A., Sinitsyn A.M. Complex compounds with manganese on the basis of 3,5-diami-

no-1,2,4-triazole derivatives. synthesis and prospects for application. *Liquid Crystals and their Application*. 2020;20(2):35-44. (In Russian). DOI: 10.18083/LCAppl.2020.2.35. EDN: OEZWGO.

20. Kunavina E.A., Sizentsov A.N., Salikova E.V., Rusyaeva M.L., Korol'kova D.S., Koz'minykh V.O. Synthesis, structure, and biological activity of magnesium(II), zinc(II), cobalt(II), and copper(II) bis(4-aryl-1-ethoxy-1-oxobutane-2,4-dionates). *Russian Journal of General Chemistry*. 2019;89(1):67-70. DOI: 10.1134/S1070363219010122.

21. Kunavina E.A., Sizentsov A.N., Levenets T.V., Salikova E.V., Korolkova D.S., Koz'minykh V.O. Synthesis, structure and biological activity of 4-arylsubstituted of 1,4-dioxo-1-ethoxy-2-alkenolates of sodium. *Bashkir Chemical Journal*. 2018;25(3):13-16. (In Russian). DOI: 10.17122/bcj-2018-3-13-16. EDN: YAQXQL.

22. Kawai H., Kitano Y., Mutoh M., Hata G. Synthesis, structure and antitumor activity of a new water-soluble platinum complex, (1R,2R-cyclohexanediamine-N,N') [2-hydroxy-4-oxo-2-pentenoato(2-)-O²] platinum(II). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1993. Vol. 4, no. 2. P. 357-361. DOI: 10.1248/cpb.41.357.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Кунавина Елена Александровна,

к.х.н., доцент, доцент,
Оренбургский государственный университет,
460018, г. Оренбург, пр. Победы, 13,
Российская Федерация,
✉ kea20072007@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4668-9782>

Сизенцов Алексей Николаевич,

к.б.н., доцент, доцент,
Оренбургский государственный университет,
460018, г. Оренбург, пр. Победы, 13,
Российская Федерация,
asizen@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1099-3117>

Брежнев Андрей Михайлович,

лаборант,
Оренбургский государственный университет,
460018, г. Оренбург, пр. Победы, 13,
Российская Федерация,
brejnevandrej@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0006-6434-1607>

Воронкова Дарья Сергеевна,

лаборант,
Оренбургский государственный университет,
460018, г. Оренбург, пр. Победы, 13,
Российская Федерация,
d.voronkova-orenburg2002@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0008-2538-1192>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena A. Kunavina,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Associate Professor,
Orenburg State University,
13, Pobedy Ave., Orenburg, 460018,
Russian Federation,
✉ kea20072007@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4668-9782>

Alexey N. Sizentsov,

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Associate Professor,
Orenburg State University,
13, Pobedy Ave., Orenburg, 460018,
Russian Federation,
asizen@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1099-3117>

Andrey M. Brezhnev,

Laboratory Assistant,
Orenburg State University,
13, Pobedy Ave., Orenburg, 460018,
Russian Federation,
brejnevandrej@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0006-6434-1607>

Daria S. Voronkova,

Laboratory Assistant,
Orenburg State University,
13, Pobedy Ave., Orenburg, 460018,
Russian Federation,
d.voronkova-orenburg2002@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0008-2538-1192>

Вклад авторов

Е.А. Кунавина – разработка концепции исследования, обсуждение результатов химического эксперимента, написание текста статьи.
А.Н. Сизенцов – проведение прикладных исследований, обработка полученных данных.
А.М. Брежнев – проведение эксперимента, осуществление расчетов, подготовка иллюстративного материала.
Д.С. Воронкова – проведение эксперимента, осуществление расчетов, подготовка иллюстративного материала.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 20.03.2024.
Одобрена после рецензирования 03.07.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

Contribution of the authors

Elena A. Kunavina – research concept development, results discussion, preparing the text of manuscript.
Alexey N. Sizontsov – conducting applied research, data processing.
Andrey M. Brezhnev – experimentation, calculations, illustrative material.
Daria S. Voronkova – experimentation, calculations, illustrative material.

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 20.03.2024.
Approved after reviewing 03.07.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.

Обзорная статья
УДК 628.355+628.3+620.3
EDN: UTLVZQ
DOI: 10.21285/achb.936



Наноструктурные материалы как опасные микрополлютанты сточных вод: источники поступления, судьба и воздействие на функциональное бактериальное сообщество активного ила

Е.И. Стрекаловская***✉, Е.И. Сипкина***

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

**Иркутский государственный университет, Иркутск, Российская Федерация

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

Аннотация. Благодаря особенностям наносостояния наноматериалы представляют интерес для промышленного, медицинского, сельскохозяйственного и экологического применения. Тем не менее выброс наночастиц в окружающую среду вызывает серьезную обеспокоенность из-за недостаточности знаний об их поведении в окружающей среде и потенциальных широкомасштабных экологических воздействиях. С одной стороны, наноматериалы воспринимаются как загрязнители, которые могут оказывать влияние на микроорганизмы активного ила и, как следствие, на эффективность процессов очистки сточных вод. С другой – некоторые из них намеренно добавляются в системы активного ила, чтобы улучшить работу системы, например осаждаемость ила, удаление тяжелых металлов или органических загрязнителей. Следовательно, наночастицы часто обнаруживаются и накапливаются в сточных водах, которые считаются основным источником выброса наночастиц в окружающую среду. Процессы с участием активного ила являются наиболее широко используемыми биологическими процессами на очистных сооружениях во всем мире благодаря высокой способности удалять питательные вещества, разлагать токсины и удерживать биомассу. Высокая концентрация наночастиц, попадающих в системы активного ила, может влиять на их рост и метаболизм. Представленные в обзоре работы показывают, что наночастицы значительно снижают относительную численность микробного сообщества активного ила, связанного с нитрификацией, денитрификацией и удалением фосфора. Таким образом, знание структуры микробного сообщества активного ила с оценкой токсичности наноматериалов будет способствовать оптимизации популяции ила и улучшению работы очистных сооружений.

Ключевые слова: наноматериалы, микроорганизмы, активный ил, токсичность, очистные сооружения

Для цитирования: Стрекаловская Е.И., Сипкина Е.И. Наноструктурные материалы как опасные микрополлютанты сточных вод: источники поступления, судьба и воздействие на функциональное бактериальное сообщество активного ила // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 339–351. DOI: 10.21285/achb.936. EDN: UTLVZQ.

Nanostructured materials as hazardous wastewater micropollutants: Sources, behavior, and impact on functional bacterial community of activated sludge

Elena I. Strekalovskaya^{*,**✉}, Evgeniya I. Sipkina^{***}

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

^{**}Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

^{***}Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Unique properties of nanoscale materials make them attractive for industrial, medical, agricultural, and environmental applications. Nevertheless, the release of nanoparticles into the environment is a major concern due to the lack of knowledge about their behavior in the environment and potential widespread environmental impacts. On the one hand, nanomaterials are perceived as pollutants that may affect activated sludge microorganisms and, consequently, the efficiency of wastewater treatment processes. On the other hand, some nanomaterials can be intentionally added to activated sludge systems to improve their performance in terms of, e.g., sludge settling and removing heavy metals or organic pollutants. As a result, nanoparticles are frequently accumulated in wastewater, which is considered to be a major source of nanoparticle release to the surrounding environment. Processes that involve the action of activated sludge are used worldwide in wastewater treatment plants due to their excellent capacity of removing nutrients, degrading toxins, and retaining biomass. High concentrations of nanoparticles entering activated sludge systems can affect their growth and metabolism. The research studies, which are reviewed in the present article, show that nanoparticles significantly reduce the relative abundance of the activated sludge microbial community associated with nitrification, denitrification, and phosphorus removal. The knowledge about the structure of the activated sludge microbial community with an assessment of nanomaterial toxicity can contribute to optimizing the sludge population and improving the performance of wastewater treatment plants.

Keywords: nanomaterials, microorganisms, activated sludge, toxicity, wastewater treatment plants

For citation: Strekalovskaya E.I., Sipkina E.I. Nanostructured materials as hazardous wastewater micropollutants: Sources, behavior, and impact on functional bacterial community of activated sludge. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):339-351. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.936. EDN: UTLVZQ.

ВВЕДЕНИЕ

Чистая вода является одним из важнейших элементов для поддержания жизни всех живых организмов. В то же время из-за быстрых темпов индустриализации и стремительного роста населения произошло загрязнение водных ресурсов во всем мире [1, 2]. Наноматериалы становятся новой группой загрязняющих веществ в окружающей среде. В мире активно увеличивается разнообразие искусственных наночастиц, а роль их использования в промышленных процессах и производстве потребительских товаров быстро растет. Между тем постепенно возникают опасения по поводу их потенциального неблагоприятного воздействия на микроорганизмы и окружающую среду, которое пока недостаточно изучено [3]. Перед учеными стоит задача более подробно рассмотреть воздействие наночастиц на различные живые организмы, первоочередными из которых являются микроорганизмы, являющиеся отличными индикаторами: благодаря своим малым размерам они имеют большую относительную поверхность контакта с водной средой и способны быстрее реагировать на ее загрязнение, чем более высокоорганизованные организмы.

Использование наноматериалов и наночастиц в товарах повседневного спроса становится все более распространенным, за счет чего их количество в потоках сточных вод увеличивается [4]. В то же время они все чаще используются для очистки сточных вод, что в конечном итоге приведет к их поступлению в окружающую среду [5, 6]. Очистные сооружения являются одним из важных путей миграции наночастиц в окружающую среду и их трансформации [7, 8]. Активный ил очистных сооружений – взвешенный микробный агрегат, играющий основную роль в удалении загрязняющих веществ, содержит множество микроорганизмов и их внеклеточные продукты. Микроорганизмы являются наиболее важными участниками систем очистки сточных вод, так как они способны разлагать различные органические вещества и обеспечивать круговорот таких элементов, как азот, фосфор и углерод [9, 10]. Поскольку доказано, что наночастицы могут проявлять токсичность, их влияние на функциональные микроорганизмы активного ила заслуживает изучения.

Сточные воды после очистки попадают в реки и озера, и наночастицы в составе очищенных сточных вод могут представлять экологическую опасность для

водных объектов. Наночастицы могут оставаться в окружающей среде в течение длительного времени, являясь потенциально или фактически токсичными для водной флоры и фауны [11]. Отработанный ил очистных сооружений попадает на иловые полигоны, накапливается на иловых картах, а также вносится в почвы в качестве удобрений. Площадь таких полигонов непрерывно растет, что ведет к отчуждению большого количества ценных земель, также наличие иловых площадок негативно сказывается на состоянии окружающей среды. Использованию ила в сельском хозяйстве препятствует большое содержание в них вредных веществ, постепенное накопление которых при постоянном внесении приводит к загрязнению почвы [12].

Наночастицы относятся к опасным микрополлютантам, которые даже в низких концентрациях обладают высокой токсичностью. В связи с этим изучение наночастиц в потоках сточных вод имеет решающее значение для оценки рисков и контроля загрязнения окружающей природной среды. Целью данного обзора явилось выявление источников наночастиц, попадающих в сточные воды, определение их судьбы в сточных водах очистных сооружений, а также обсуждение их влияния на микроорганизмы активного ила – главного компонента биологической очистки сточных вод.

НАНОЧАСТИЦЫ В СТОЧНЫХ ВОДАХ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

Нанотехнологии являются динамично развивающейся областью научного интереса во всем мире, который связан с их уникальными физико-химическими свойствами (магнитными, оптическими и электрохимическими) [13]. Продукты, полученные в результате применения нанотехнологий, можно отнести к категории наноматериалов (таких как наночастицы, нанокомпозиты, нанотрубки и т.д.), наноинструменты и наноустройства [14].

В последние годы использование сконструированных наночастиц увеличилось экспоненциально [15]. Наноматериалы – как органические, так и неорганические – могут быть потенциальными загрязнителями и остаются по большей части неидентифицированными из-за ограничений аналитических методов их определения. Наночастицы относятся к опасным микрополлютантам – загрязнителям, проявляющим токсичность в низких концентрациях (порядка нг/л). Они могут не только напрямую влиять на живые организмы, но и служить переносчиками органических и неорганических загрязнителей, а также усиливать токсическое действие других микрополлютантов [16].

Наночастицы все шире применяются в промышленных и бытовых целях, что влечет за собой рост объемов их производства, выбросов наночастиц в окружающую среду и связанные с этим риски для экосистем. На рисунке представлены основные источники, транспорт, судьба и экологические эффекты наноматериалов в потоках сточных вод. Нанотехнологии имеют потенциальное применение в сельском хозяйстве, машиностроении, производстве и медицине. Использование наноматериалов широко распространено и охватывает энергетический сектор, сектор телекоммуникаций, компьютерную технику, агрохимию и продукцию личной гигиены. Масштаб использования наноматериалов постоянно

растет, и все большее их количество попадает в различные водоисточники [17]. Использование наноматериалов в медицинских целях имеет весомое преимущество благодаря их уникальным свойствам, таким как сверхмалый размер, большое соотношение площади поверхности к массе и высокая реакционная способность [18]. Они успешно используются в доставке лекарств, терапии онкологии, нейропротекции, тканевой инженерии и визуализации тканей. Данный факт указывает на то, что использование наноматериалов в медицине обязательно приведет к их попаданию в сточные воды на различных этапах производства и применения, особенно при производстве, применении и утилизации фармсредств, а также в быту [4, 19]. Кроме того, наноматериалы становятся все более распространенными в наших повседневных продуктах [4]. Среди продуктов, получаемых на основе наночастиц, около 80% состоит из оксидов металлов, в которых 95% составляют ZnO, TiO₂, Fe₂O₃, Al₂O₃ и SiO₂ [20].

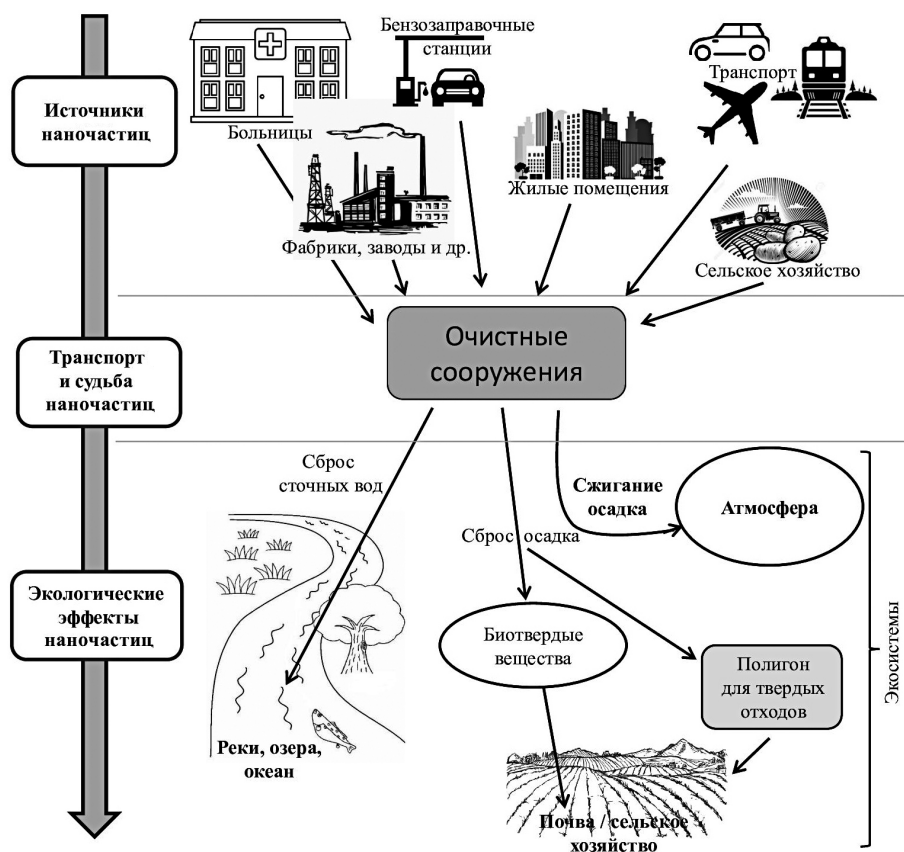
Данные исследований разнятся, но часть ученых указывает на то, что очистные сооружения сточных вод потенциально могут удалять более 90% поступающих наночастиц, таких как Ag, SiO₂, TiO₂ или CeO₂ [21]. При этом не исключено, что остаточные концентрации некоторых наночастиц и продукты их трансформации в сточных водах могут влиять на некоторые организмы водных экосистем на стадиях их размножения и роста [22]. Напротив, В.С. Соуза с соавторами утверждают, что наночастицы TiO₂, Ag и ZnO были обнаружены в опасных количествах после финишного процесса очистки сточных вод мембранной фильтрацией [23].

Около 90% стоков очистных сооружений составляют бытовые сточные воды [24]. Сточные воды считаются одним из основных источников распространения наночастиц в природной среде [25].

Наночастицы попадают в сточные воды следующим образом:

- в результате производственных процессов, в которых используются наноматериалы;
 - после утилизации потребительских товаров, содержащих компоненты наноматериалов;
 - из-за применения наноматериалов на очистных сооружениях;
 - вследствие косвенных сбросов в результате разложения потребительских товаров на полигонах твердых бытовых отходов, а также из природных объектов [26].
- Концентрация наноматериалов в сточных водах зависит прежде всего, от:
- типа сточных вод (промышленные или бытовые);
 - количества производимого или используемого наноматериала;
 - концентрации «фиксированного» и «свободного» наноматериала в коммерческом продукте;
 - фракции, которая попадает в поток сточных вод, и степени разбавления;
 - степени агломерации или адсорбции, происходящей в потоках сточных вод, которая изменяет форму наночастиц или удаляет их из раствора [4].

Хорошо известен факт того, что реагенты на основе наночастиц используются в качестве адсорбентов тяжелых металлов и радионуклидов. Это играет важную роль в процессе очистки сточных вод. Помимо меньшего размера частиц, еще одним фактором, который может



Схематичное изображение, иллюстрирующее происхождение, судьбу наноматериалов и экологические последствия их влияния в потоках сточных вод

Schematic representation illustrating the origin, fate and environmental impacts of nanomaterials in wastewater streams

усложнить судьбу наночастиц при рекультивации сточных вод, является их функционализация [27]. Функционализация – это процесс, посредством которого молекулы органических и поверхностно-активных веществ прикрепляются к наночастицам, удерживая их в дисперсном состоянии. В результате наночастицы могут вести себя совсем иначе, нежели обычные растворенные загрязнители, а также взвешенные частицы микронного размера во время очистки сточных вод [28].

Многие наночастицы не растворяются в воде, а образуют термодинамически нестабильные коллоидные дисперсии, агрегатное состояние которых зависит от pH, ионной прочности и наличия органических компонентов в составе наноматериалов [29]. Агрегация частиц определяется межчастичным взаимодействием, зависящим от вязкости и поляризуемости жидкости. Заряд наночастиц в жидкостях можно стабилизировать с помощью электрохимических процессов на поверхности. Силы взаимодействия разных наночастиц между собой и взаимодействия их с жидкостью играют ключевую роль в описании физических и химических процессов, а также временной эволюции свободных наночастиц в случае их взаимодействия с компонентами сточных вод [28].

Скорость осаждения частиц является экспоненциальной функцией размера частиц. Соответственно,

скорость осаждения наночастиц значительно ниже и, следовательно, время осаждения – намного больше, чем у частиц микронного или субмикронного размера того же материала. В случае наночастиц гравитационный эффект может стать значительным только тогда, когда они взаимодействуют с другими коллоидными частицами, присутствующими в сточных водах. Связывание с коллоидными или другими микрочастицами также изменяет гидродинамический диаметр наночастиц с соответствующим изменением их плотности и плавучести. Следовательно, без добавления коагулянтов и флокулянтов для увеличения среднего размера частиц или без адсорбции наночастиц крупными неорганическими частицами маловероятно, что наночастицы будут удалены в первичных отстойниках очистных сооружений. При этом большинство процессов первичной очистки включает широкое использование коагулянтов, что может привести к адсорбции наночастиц и их дальнейшему осаждению [30]. Это подтверждается данными, согласно которым М.А. Кайзер с соавторами сообщили об эффективности удаления nano-TiO_2 от 70 до 85% на восьми очистных сооружениях США; при этом большая часть массы TiO_2 обнаружена в отстаившемся иле [31]. Аналогичная эффективность удаления и связь с осадком были зарегистрированы для наночастиц CeO_2 [32]. В то

же время Л. Хоу с соавторами продемонстрировали, что значительная часть (более 90%) стабилизированных цитратом наночастиц Ag оставалась в сточных водах после первичного осветления и попадала на следующие стадии очистки. Впоследствии наночастицы Ag эффективно удалялись в каждом цикле обработки на протяжении 15-дневного эксперимента в реакторе периодического действия (РПД) [33].

После первичной очистки подключаются этапы вторичной очистки с использованием биологических процессов, которые включают системы увеличения количества суспендированной биомассы и/или фиксированной биопленки за счет роста и размножения микроорганизмов. Наночастицы в процессе вторичной обработки неизбежно будут взаимодействовать с микробными клетками. Адгезия к клеточной стенке микроорганизмов и внеклеточным полимерным веществам (ВПВ) наночастиц, ассоциированных с микроорганизмами, а также поглощение их микроорганизмами создаст градиент концентрации в перемешиваемом слое в непосредственной близости к микробным клеткам, что приведет к образованию фиксированных пленок или устойчивых агрегатов, представляющих собой комбинацию обоих компонентов – наночастиц и микроорганизмов. Такие образования могут иметь жизненно важные последствия для метаболической активности микроорганизмов, например ограничение связи между клеткой и окружающей ее средой («чувство кворума» [28, 34, 35].

Таким образом, проходя через городскую трубопроводную сеть, масса наночастиц в конечном итоге накапливается на очистных сооружениях, которые обычно работают с использованием технологии активного ила [36]. Из-за абсорбции, агрегации и осаждения в активном иле наночастицы легко остаются в его избыточном количестве, что создает долгосрочные проблемы в процессах утилизации активного ила.

ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ НА МИКРООРГАНИЗМЫ АКТИВНОГО ИЛА ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

Прослеживание судьбы наночастиц в системах очистки сточных вод показало, что большинство их накапливается в системах биологической очистки сточных вод. Взвешенный микробный агрегат активный ил часто применяется в сточных водах для удаления органических соединений и питательных веществ (азота и фосфора) в результате метаболических процессов. Активный ил представляет собой совокупность биологических хлопьев средних размеров (от 0,1 до 3 мм) или гранул (от 1,5 до 4 мм), состоящих из клеток микроорганизмов, внеклеточных биополимеров, а также органических и неорганических соединений [37].

Малые размеры прокариот обеспечивают непосредственное взаимодействие клетки с наночастицами. В ходе эволюции живые организмы не сталкивались с такими наночастицами и поэтому не имеют хорошо адаптированных защитных механизмов для борьбы с их неблагоприятными свойствами и токсичностью [38]. Поэтому ожидается, что наночастицы, накапливающиеся в хлопьях активного ила, изменят соотношения в популяции бактерий активного ила и взаимодействии между ними,

что снизит эффективность удаления загрязнений [39].

Наночастицы металлов. Показано, что наночастицы серебра (Ag, наночастицы Ag) оказывали неблагоприятное воздействие на микроорганизмы микробного сообщества активного ила [40]. В концентрации всего 0,4 мг/л наночастицы Ag ингибировали рост нитрифицирующих бактерий, а в концентрации 19 мг/л ингибировали в целом анаэробную микробную активность в биомассе осадка сточных вод. О. Чои с соавторами наблюдали, что наночастицы Ag (средний размер 14 ± 6 нм) в концентрации 1 мг/л на 86% ингибировали рост и дыхание нитрифицирующих бактерий. При этом наночастицы размером менее 5 нм оказались наиболее токсичными для бактерий [41]. При концентрации 1 мг/л наночастицы Ag (21 нм) не оказывали влияния на гетеротрофы, но ингибировали нитрифицирующие бактерии, что указывает на большую уязвимость нитрификации, чем денитрификации при той же концентрации наночастиц [42].

После воздействия более крупных наночастиц Ag со средним размером 35 нм наблюдалось значительное (более чем на 50%) снижение численности рода *Nitrosomonas* и типа *Chloroflexi*, а также исчезновение представителей рода *Nitrosococcus* [43], которые могут участвовать в окислении углерода и нитрификации [44], что говорит о подавлении процессов удаления азота. В другом исследовании токсическое действие наночастиц Ag показано на бактериях, окисляющих аммиак при концентрации 0,25–10 мг/л [45].

Напротив, Ч. Шэн с соавторами обнаружили, что микробные ассоциации активного ила и биопленки были устойчивы к обработке наночастиц Ag (менее 15 нм), однако после удаления растворимых ВПВ ассоциации становились более чувствительными к токсическому действию наночастиц [46]. ВПВ являются основными компонентами микробных агрегатов, удерживая их вместе в трехмерной матрице [47]. Показано, что ВПВ могут защищать микробные сообщества от токсичности наночастиц [48]. Общий отрицательный заряд бактериальных ВПВ отталкивает наночастицы Ag, которые также заряжены отрицательно, и таким образом защищает бактерии от токсичности наночастиц. ВПВ также способны подавлять активные формы кислорода, образующиеся в результате обработки наночастиц Ag. Кроме того, ВПВ способны связывать высвобождающиеся ионы Ag^+ из наночастиц, тем самым уменьшая степень контакта с бактериальными клетками. При этом очевидным является то, что чем меньше частица, тем больше отношение ее удельной площади поверхности к объему и выше химическая реактивность и биологическое действие. Исследования показали, что ВПВ как основные компоненты слизистой матрицы хлопьев активного ила способны улавливать наночастицы и предотвращать их диффузию в гранулы или хлопья активного ила. Таким образом, бактериальные клетки, распространенные на поверхности хлопьев или гранул активного ила, подвергаются большему токсическому воздействию наночастиц, чем бактерии, находящиеся внутри хлопьев. Однако при высоких концентрациях наночастиц Ag защитный барьер ВПВ снижается [49].

При более полном изучении микробного разнообразия активного ила с помощью пиросеквенирования показано, что в микробных сообществах доминировали протеобактерии, на долю которых приходилось от 32,9 до 45,7%

от общего числа бактериальных последовательностей, как в образцах, обработанных наночастицами, так и в контрольных образцах. Более распространенными после воздействия наночастиц являлись протеобактерии классов α и γ по сравнению с β и δ в контроле [50].

При воздействии комплекса наночастиц Ag-Fe (35 нм) отмечалось полное уничтожение типов *Actinobacteria*, *Chloroflexi* и снижение численности *Proteobacteria*, при этом относительная численность подклассов α - и δ -протеобактерий увеличивалась наряду с представителями типов *Planctomycetes*, *Acidobacteria* и *Firmicutes* [51]. Поскольку протеобактерии играют важную роль в процессе удаления органических отходов, фосфора и азота из сточных вод, негативное влияние наночастиц на численность данных представителей отрицательно скажется на производительности очистных сооружений. Также отмечается толерантность сфингобактерий (*Sphingobacteria*) к наночастицам Ag, которые связаны с быстрой деградацией лабильных органических веществ. Вместе с этим происходило увеличение численности представителей типа *Bacteroidetes*, способствующих вспениванию и набуханию осадка [52], что приводит к ухудшению работы активного ила и увеличивает эксплуатационные расходы на борьбу с пенообразованием на очистных сооружениях. Кроме того, наночастицы Ag повреждают структуру хлопьев и гранул активного ила, тем самым затрудняя осаждение и переработку осадка сточных вод [43].

Напротив, воздействие наночастиц хрома (Cr, средний размер около 50 нм) в концентрации 1 мг/л значительно способствовало процессу денитрификации и удалению фосфора в системе активного ила. Относительное обилие денитрифицирующих и удаляющих фосфор микроорганизмов (роды *Denitratisoma*, *Tauera*, *Dechromonas* и *Deffluviococcus*) значительно увеличилось, как и представителей *Candidatus Accumulibacter*, известных как организмы, накапливающие полифосфаты. И только относительное обилие *Candidatus Competibacter* (гликоген-аккумулирующие организмы) значительно снизилось [53].

При изучении влияния на образцы флокулированного активного ила (хлопьевидный ил) наноразмерным нуль-валентным железом (ННВЖ) (35 нм) в концентрации 100 мг/л увеличивалась относительная численность филов *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* и *Planctomycetes*. В образцах аэробного гранулированного ила по сравнению с хлопьевидным после воздействия ННВЖ регистрировались бактерии, относящиеся к типам (родам) *Acidobacteria*, *Thermi*, *Eubacteria*. Кроме того, было отмечено увеличение количества *Planctomycetes* на уровне филума и элиминация *Fimbriimonadia*, *Deinococci*, *Methanobacteria*, *Acidobacteria* на уровне класса. Важную роль в флокуляции играют протеобактерии, большее содержание которых отмечалось в аэробном гранулированном иле, при этом β -*Proteobacteria* и γ -*Proteobacteria* были преобладающими классами. Результаты продемонстрировали, что структура бактериального сообщества в гранулах была более стабильной к воздействию ННВЖ, чем в хлопьях активного ила, благодаря плотности и наличию нитчатых бактерий [54].

Таким образом, исследования показали, что 95–97,5% наночастиц попадают в активный ил после вторичной биологической очистки и около 5% попадают в различные

водоисточники после финишного процесса очистки сточных вод. Избыточный активный ил с осажденными наночастицами, в свою очередь, активно используется в качестве мелиоранта почв, что увеличивает потенциальный риск для почвенных экосистем. Следовательно, необходимо выбрать подходящую утилизацию избыточного ила на городских очистных сооружениях для предотвращения миграции и трансформации наночастиц из ила в другие экологические экосистемы.

Наночастицы оксидов металлов и неметаллов. При исследовании анаэробных РПД с низким содержанием растворенного кислорода было обнаружено, что 50 мг/л нано-TiO₂ и нано-SiO₂ после длительного воздействия уменьшали микробное разнообразие и вызывали сдвиг в бактериальном сообществе активного ила. Следует отметить, что в присутствии наночастиц TiO₂ (50 мг/л) представители *Nitrosomonas* spp. элюировали из активного ила, а количество представителей *Stenotrophomonas* spp., способных переносить высокие уровни металлических примесей и осуществлять денитрификацию нитратов, увеличивалось. Кроме того, было обнаружено, что в присутствии 50 мг/л наночастиц TiO₂ наблюдалось доминирование фосфат-аккумулирующих микроорганизмов (*Candidatus Accumulibacter phosphatis*) и представителей семейства Rhodocyclaceae [55]. Фосфат-аккумулирующие микроорганизмы, как известно, представляют собой неклассифицированный тип бетапитеобактерий, которые являются распространенными участниками бактериального сообщества на очистных сооружениях, осуществляющих усиленное биологическое удаление фосфора и накапливающих полифосфаты [56]. Увеличение численности фосфат-аккумулирующих микроорганизмов и значительное снижение нитрифицирующих бактерий после воздействия наночастиц подтверждается результатами других работ [57, 58].

Реакции нитрификации, денитрификации, а также высвобождения и поглощения фосфора катализируются ферментами. Обычно автотрофные бактерии (АОБ), окисляющие аммиак, используют аммиакмонооксидазу, а последующее окисление нитрита в нитрат осуществляют нитритоксидающими бактериями (НОБ) с помощью нитритоксидоредуктазы. Согласно приведенным выше исследованиям, несмотря на отсутствие резкого влияния на удаление азота и фосфора из сточных вод, наночастицы TiO₂ в концентрации 50 мг/л после длительного воздействия вызывали значительное замедление биологического удаления азота. Основными причинами такого ингибирующего эффекта является снижение содержания АОБ и ингибирование активности аммиакмонооксигеназы и нитритоксидоредуктазы. При этом не отмечалось изменений в активности экзополифосфатазы и полифосфаткиназы, связанных с удалением фосфора и трансформацией внутриклеточных полигидроксикарбоновых и гликогена, что согласуется с отсутствием измеримого влияния наночастиц TiO₂ на биологическое удаление фосфора. В этом исследовании ВПВ, выделяемые активным илом, вероятно, также защищают целостность поверхности активного ила после длительного воздействия наночастиц TiO₂ [57].

Нано-TiO₂ (14,1–29,8 нм, 50 мг/л) заметно и синергически ингибировали бактериальное дыхание, что указывает на тяжелый окислительный стресс в клетках. С понижением концентрации наночастиц до 1 мг/л

данный токсический эффект сохранялся [59]. При этом отмечалось значительное снижение численности представителей родов *Acinetobacter*, *Delftia*, а также микроорганизмов в группе *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, входящих в состав семейства Rhizobiaceae, которые относятся к числу наиболее важных азотфиксирующих бактерий [60]. Однако по другим исследованиям иные наночастицы, такие как наночастицы ZnO (89 нм, 10 и 50 мг/л) и Cu (30–50 нм, 5 мг/л), снижали эффективность удаления азота и фосфора за счет подавления соответствующих микроорганизмов и активности ферментов [61, 62]. При концентрации 1 мг/л наночастиц ZnO отмечалось незначительное изменение численности бактерий активного ила. При увеличении концентрации наночастиц ZnO до 50 мг/л наблюдалось снижение относительной численности филлов *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Nitrospirae*, при этом представители фила *Firmicutes* становились доминирующими микроорганизмами активного ила. В целом результаты показали, что наночастицы ZnO снижали относительную численность грамотрицательных бактерий (таких как протеобактерии) по сравнению с грамположительными бактериями (*Firmicutes*) [63]. Вероятно, это связано с различием в структуре клеточной стенки. Грамположительные бактерии и их внутриклеточное содержимое защищено толстым слоем пептидогликана, содержащимся в составе клеточной стенки и составляющим до 90% от ее массы. Напротив, грамотрицательные бактерии имеют клеточную стенку, в состав которой входит тонкий слой пептидогликана (до 10%) и внешняя мембрана, что позволяет наночастицам легко проникать в клетку, тем самым нарушая клеточный метаболизм и приводя к гибели бактериальной клетки [64].

Воздействие наночастиц CeO₂ (70–150 нм) уменьшало богатство представителей филума *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* и *Actinobacteria* в активном иле очистных сооружений. С увеличением концентрации наночастиц токсическое воздействие усиливалось. После прекращения воздействия наночастиц CeO₂ в течение двухнедельного периода восстановления микробное сообщество существенно не восстанавливалось [65]. Отмечается, что токсичность наночастиц ZnO выше, чем наночастиц CeO₂ и TiO₂, благодаря хорошей растворимости [66]. Токсичность NPs ZnO при растворении объясняется активным высвобождением ионов Zn²⁺ из наночастиц.

При воздействии наночастиц CuO (40 нм) на активный ил регистрировалось снижение относительной численности γ -*Proteobacteria*, α -*Proteobacteria*, *Planctomycetia* и *Ignavibacteria* с увеличением концентрации от 5 до 60 мг/л. Отмечалось уменьшение относительной численности бактерий родов *Dokdonella*, *Azospirillum* и *Hyphomicrobium*, способных восстанавливать нитрат до азота в анаэробной среде. С увеличением концентрации наночастиц CuO представители родов, обладающих денитрифицирующей способностью (*Comamonas*, *Flavobacterium*, *Rhodanobacter* и *Azoarcus*), имели тенденцию к увеличению относительной численности. Относительная численность представителей родов *Pseudomonas* снижалась с 3,6 до 0,1% при увеличении концентрации наночастиц CuO в среде от 5 до 60 мг/л. Представители рода *Pseudomonas* связаны

как с денитрификацией, так и с удалением фосфора в системах биологической очистки сточных вод [67]. По сравнению с представителями рода *Pseudomonas* относительная численность *Candidatus Accumulibacter* несколько увеличивалась при концентрации наночастиц 5, 30 и 60 мг/л, что было связано с поглощением фосфора в кислородной среде и высвобождением фосфора в анаэробной среде активного ила в процессе очистки сточных вод [68, 69]. Полученные результаты на уровне рода исследуемых микроорганизмов позволяют предположить, что присутствие наночастиц CuO в притоке сточных вод, очевидно, влияет на относительную численность микробного сообщества, связанного с нитрификацией, денитрификацией и удалением фосфора.

Исследования воздействия наночастиц Fe₃O₄ (20 нм) на процессы активного ила продемонстрировали, что в концентрации 5–60 мг/л наночастицы приводили к угнетению активности микробных ферментов и снижению скорости удаления азота и фосфора [67]. В других исследованиях показано, что наночастицы Fe₃O₄ (20 нм) не оказывали негативного влияния на удаление азота, тогда как специфическая активность анаммокса при концентрации, равной 200 мг/л, значительно возрастала, причем наночастицы Fe₃O₄ также влияли на доминантные представители бактериальной флоры [70, 71]. Также в исследовании продемонстрировано ингибирование микробной активности АОБ и усиление микробной активности НОБ после воздействия высокой концентрации наночастиц Fe₃O₄ в РПД. При концентрации 60 мг/л наночастиц Fe₃O₄ отмечалось снижение относительной численности на уровне классов *Alphaproteobacteria* (с 6,70% при 0 мг/л до 3,67% при 60 мг/л наночастиц Fe₃O₄), *Gammaproteobacteria* (с 43,41 до 8,19%, соответственно), *Anaerolineae* (с 6,14 до 2,74%), *Ignavibacteria* (с 2,30 до 0,70%), *Planctomycetia* (с 0,90 до 0,40%) и *Actinobacteria* (с 0,90 до 0,20%). Однако относительная численность β -*Proteobacteria*, δ -*Proteobacteria*, *Sphingobacteriia* и *Flavobacteriia* увеличивалась с 9,34, 1,67, 14,52 и 1,27% при 0 мг/л наночастиц Fe₃O₄ до 27,40, 6,04, 26,15 и 5,23% при 60 мг/л наночастиц Fe₃O₄ соответственно. На уровне рода относительная численность *Nitrosomonas* и *Nitrosospira* в присутствии наночастиц Fe₃O₄ снижалась. Относительная численность рода *Nitrospira* увеличивалась до 2,1% при концентрации наночастиц Fe₃O₄ 5 мг/л, а с увеличением концентрации наночастиц Fe₃O₄ до 30 и 60 мг/л наблюдалось снижение численности и ее возвращение к значениям до воздействия [67]. *Nitrosomonas* и *Nitrosospira* связаны с процессом окисления аммиака до нитрита, а *Nitrospira* тесно связаны с процессом окисления нитрита в нитрат [72, 73]. Полученные результаты показали, что наночастицы Fe₃O₄, очевидно, вызывают изменение микробного богатства *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* и *Nitrospira* в активном иле очистных сооружений, что может влиять на процессы окисления аммиака и окисления нитритов в РПД. Также отмечалось снижение относительной численности представителей родов *Devosia*, *Paracoccus* и *Rhodanobacter* с 1,1, 0,9 и 37,5% при 0 мг/л наночастиц Fe₃O₄ до 0,2, 0,3 и 2,0% при 60 мг/л наночастиц соответственно. Ранее сообщалось, что роды *Devosia*, *Paracoccus* и *Rhodanobacter* обладают способностью восстанавливать нитраты или нитриты [74, 75]. В то же время численность родов *Thauera*, *Comamonas* (β -протеобактерии)

и *Hyphomicrobium* (α -протеобактерии), проявляющих денитрифицирующую способность, имела тенденцию к увеличению их относительного обилия с увеличением концентрации наночастиц Fe_3O_4 . Известно, что бактерии рода *Thauera* способны разлагать широкий спектр органических кислот и ароматических соединений [76]. Относительная численность *Candidatus Accumulibacter* также увеличивалась с 0,9% при 0 мг/л наночастиц Fe_3O_4 до 9,8% при 60 мг/л наночастиц. Фосфат-аккумулирующие организмы осуществляют биологическое удаление фосфора путем его поглощения и запасаения в виде внутриклеточных полифосфатов, которые выводятся из системы в конце аэробного периода вместе с активным илом (так называемым избыточным активным илом) [77]. Отмечалось заметное увеличение относительной численности в активном иле представителей рода *Haliscamenobacter* при воздействии наночастиц Fe_3O_4 в разных концентрациях (5, 30 и 60 мг/л). Род *Haliscamenobacter* по сравнению с другими микроорганизмами способен секретировать большее количество ВПВ [78], которые могли предохранять его от токсичности наночастиц. Представители рода *Haliscamenobacter* – обычные обитатели аэротенков, присутствующие в незначительных количествах, однако в подходящих для них условиях массово размножаются и вызывают вспухание активного ила, который выносятся из вторичных отстойников, ухудшая качество очищенной воды [67]. В исследовании Ц. Цзэн с соавторами от 2021 г. показано, что при концентрации наночастиц Fe_3O_4 (300 и 600 мг/л) в РПД отмечается увеличение относительной численности протеобактерий (37,4 и 39,1% соответственно), а при дальнейшем увеличении концентрации (800 мг/л) наночастиц отмечается их снижение до 29,1%. Численность представителей микроорганизмов, относящихся к *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Thermus*, при концентрации наночастиц Fe_3O_4 (300 и 600 мг/л) была заметно выше (30,5–32,8, 20,6–21,8 и 3,7–4,0% соответственно), чем в контроле, то есть при отсутствии наночастиц (28,0, 17,7 и 3,1% соответственно), а численность этих типов бактерий при концентрации наночастиц, равной 800 мг/л, снижалась и составляла 28,0, 17,6 и 2,5% соответственно. Данные результаты показали, что увеличение концентрации наночастиц Fe_3O_4 способствовало росту этих типов, в то время как относительно высокая концентрация наночастиц Fe_3O_4 (более 800 мг/л) ингибировала рост исследуемых типов бактерий. При концентрации наночастиц Fe_3O_4 , равной 300 и 600 мг/л, отмечалось также увеличение численности основных родов бактерий в активном иле, таких как *Pseudomonas*, *Rhodanobacter* и *Bacillus*. Однако при концентрации наночастиц Fe_3O_4 выше 600 мг/л численность указанных родов снижалась. Как известно, *Pseudomonas*, *Rhodanobacter* и *Bacillus* способны разлагать фенольные соединения и полициклические ароматические углеводороды. Таким образом, относительно низкая концентрация наночастиц Fe_3O_4 повышала эффективность деградации фенола, тогда как относительно высокая концентрация наночастиц приводила к ее снижению в РПД [79]. Наличие ВПВ в системе активного ила также могло в некоторой степени защитить микроорганизмы от токсического воздействия наночастиц Fe_3O_4 , что позволило сохранить эффективность деградации фенола. Поскольку наночастицы Fe_3O_4

являются разновидностью магнитных наночастиц, они могут вызывать внутренний магнитный биоэффект и ускорять рост и активность микроорганизмов [80].

Наночастицы Al_2O_3 также считаются одними из наиболее распространенных наночастиц, поступающих на очистные сооружения [7]. И. Чэнь с соавторами [81] обнаружили, что кратковременное воздействие наночастиц Al_2O_3 (70–100 нм) в концентрации от 1 до 50 мг/л оказывало незначительное влияние на эффективность нитрификации, денитрификации и удаление фосфора из сточных вод. Тем не менее при длительном воздействии наночастиц Al_2O_3 в концентрации более 50 мг/л наблюдалось снижение эффективности удаления общего азота с 80,4 до 62,5% за счет подавления процесса денитрификации, хотя биологическое удаление фосфора и трансформация внутриклеточных полигидроксикарбонатов и гликогена не пострадали. В другом исследовании гетеротрофные микроорганизмы, составлявшие большую часть бактериального сообщества в биомассе активного ила, незначительно угнетались даже при высоких концентрациях наночастиц до 1000 мг/л при размере частиц менее 50 нм. Степень их ингибирования варьировала от 9,3 до 11,1%. В свою очередь, биохимическая активность автотрофных бактерий, ответственных за удаление азота из сточных вод, пострадала значительно сильнее, чем это наблюдалось у гетеротрофных микроорганизмов. Степень ингибирования биохимической активности нитрифицирующих микроорганизмов составила более 50%, что свидетельствует о значительном влиянии наночастиц Al_2O_3 на нитрификаторов. Наиболее вероятной причиной ингибирования нитрифицирующих бактерий наночастицами Al_2O_3 является инактивация ферментов, катализирующих превращение аммонийного азота в нитрит, а затем в нитрат [82].

Таким образом, вариации относительной численности микробного сообщества на уровне типов, классов и родов показали, что присутствие наночастиц, очевидно, влияет на микробное богатство и разнообразие активного ила.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Длительное воздействие высоких доз наночастиц приводит к уменьшению или исчезновению некоторых бактерий, оказывает ингибирующее действие на деятельность бактериальных ферментов, что влияет на работоспособность активного ила очистных сооружений. Из-за различной структуры активный ил очистных сооружений по-разному реагирует на присутствие наночастиц. Так, гранулированный активный ил представляет собой агрегаты с компактной внутренней частью, напоминающие по характеристикам биопленки, что отличает его от обычных хлопьев активного ила и обуславливает его первоначальную устойчивость к воздействию наночастиц и к защите бактерий, присутствующих во внутренних слоях гранулированного активного ила. Однако наружный слой гранул (до 100 мкм от поверхности гранул) заселен аэробными бактериями, в том числе нитрификаторами, которые по результатам экспериментальных данных угнетались воздействием наноматериалов в большей степени, чем другие представители бактериального сообщества активного ила.

В целом представленные в обзоре работы показывают, что наночастицы значительно снижают относительную

численность микробного сообщества активного ила, отвечающего за удаление соединений углерода, азота и фосфора. Различное влияние наночастиц на микрофлору активного ила зависило как от их химического состава, так и от используемых концентраций.

Избыточная нагрузка сточных вод, поступающих в системы очистки, нарушает нормальные биологические процессы в активном иле. Существенное влияние на производительность микроорганизмов активного ила, вероятно, возможно и за счет токсического воздействия поступающих наноматериалов в потоки сточных вод.

Отсутствие «эффективных» микроорганизмов в конечном итоге приведет к тому, что сточные воды низкого качества будут поступать в окружающую среду, нанося ущерб как окружающей среде, так и человеку.

Таким образом, накопление наночастиц в активном иле очистных сооружений влияет на функции микробных сообществ и процессы круговорота элементов, так как микроорганизмы являются важными компонентами, участвующими в биогеохимических циклах, включая циклы углерода, азота, серы и фосфора.

REFERENCES

1. Ali I., Aboul-Enein H.Y. *Chiral pollutants: distribution, toxicity and analysis by chromatography and capillary electrophoresis*. John Wiley & Sons; 2004, 352 p. DOI: 10.1002/0470867825.
2. Dao M.U., Ha T.D., Sirotkin A., Le V.T., Nguyen L.A., Do T.H., et al. Combination of magnetic activated carbon and activated sludge for methylene blue and nickel (II) ions removal in aerobic biological treatment. *Vietnam Journal of Chemistry*. 2023;61(S3):90-96. DOI: 10.1002/vjch.202300089.
3. Zhu Y., Liu X., Hu Y., Wang R., Chen M., Wu J., et al. Behavior, remediation effect and toxicity of nanomaterials in water environments. *Environmental Research*. 2019;174:54-60. DOI: 10.1016/j.envres.2019.04.014.
4. Kunhikrishnan A., Shon H.K., Bolan N.S., El Saliby I., Vigneswaran S. Sources, distribution, environmental fate, and ecological effects of nanomaterials in wastewater streams. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2015;45(4):277-318. DOI: 10.1080/10643389.2013.852407.
5. Aragaw T.A., Bogale F.M., Aragaw B.A. Iron-based nanoparticles in wastewater treatment: a review on synthesis methods, applications, and removal mechanisms. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2021;25(8):101280. DOI: 10.1016/j.jscs.2021.101280.
6. Shukla S., Khan R., Daverey A. Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles, and their applications in wastewater treatment: a review. *Environmental Technology & Innovation*. 2021;24:101924. DOI: 10.1016/j.eti.2021.101924.
7. Lazareva A., Keller A.A. Estimating potential life cycle releases of engineered nanomaterials from wastewater treatment plants. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2014;2(7):1656-1665. DOI: 10.1021/sc500121w.
8. Wang S., Liu Z., Wang W., You H. Fate and transformation of nanoparticles (NPs) in municipal wastewater treatment systems and effects of NPs on the biological treatment of wastewater: a review. *RSC Advances*. 2017;7:37065-37075. DOI: 10.1039/C7RA05690G.
9. Zaborowska E., Lu X., Makinia J. Strategies for mitigating nitrous oxide production and decreasing the carbon footprint of a full-scale combined nitrogen and phosphorus removal activated sludge system. *Water Research*. 2019;162:53-63. DOI: 10.1016/j.watres.2019.06.057.
10. Kulikova Y., Klementev S., Sirotkin A., Mokrushin I., Bassyouni M., Elhenawy Y., et al. Aqueous phase from hydrothermal liquefaction: composition and toxicity assessment. *Water*. 2023;15(9):1681. DOI: 10.3390/w15091681.
11. Velzeboer I., Hendriks A.J., Ragas A.M.J., van de Meent D. Aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008;27(9):1942-1947. DOI: 10.1897/07-509.1.
12. Zhang Q., Zou D., Zeng X., Li L., Wang A., Liu F., et al. Effect of the direct use of biomass in agricultural soil on heavy metals – activation or immobilization? *Environmental Pollution*. 2021;272:115989. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115989.
13. Bystrzejewska-Piotrowska G., Golimowski J., Urban P.L. Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Management*. 2009;29(9):2587-2595. DOI: 10.1016/j.wasman.2009.04.001.
14. Rambaran T., Schirhagl R. Nanotechnology from lab to industry – a look at current trends. *Nanoscale Advances*. 2022;4:3664-3675. DOI: 10.1039/D2NA00439A.
15. Dibyanshu K., Chhaya T., Raychoudhury T. A review on the fate and transport behavior of engineered nanoparticles: possibility of becoming an emerging contaminant in the groundwater. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2023;20:4649-4672. DOI: 10.1007/s13762-021-03835-9.
16. Gusev A.A., Zakharova O.V., Vasyukova I.A., Evtushenko N.A., Vasilieva S.G., Lukyanov A.A., et al. Nanoparticles in the aquatic environment: the risks associated with them and the possibilities of their mitigation with microalgae. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2021;76:165-174. DOI: 10.3103/S0096392521040039.
17. Malakar A., Snow D.D. Nanoparticles as sources of inorganic water pollutants. In: Devi P., Singh P., Kansal S.K. (eds). *Inorganic Pollutants in Water*. Oxford: Elsevier; 2020, p. 337-370. DOI: 10.1016/B978-0-12-818965-8.00017-2.
18. Radad K., Al-Shraim M., Moldzio R., Rausch W.-D. Recent advances in benefits and hazards of engineered nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2012;34(3):661-672. DOI: 10.1016/j.etap.2012.07.011.
19. Wang J., Nabi M.M., Mohanty S.K., Afrooz A.N., Cantando E., Aich N., et al. Detection and quantification of engineered particles in urban runoff. *Chemosphere*. 2020;248:126070. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126070.
20. Forest V., Hochepiet J.-F., Pourchez J. Importance of choosing relevant biological end points to predict nanoparticle toxicity with computational approaches for human health risk assessment. *Chemical Research in Toxicology*. 2019;32(7):1320-1326. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.9b00022.
21. Westerhoff P., Atkinson A., Fortner J., Wong M.S., Zimmerman J., Gardea-Torresdey J., et al. Low risk posed by engineered and incidental nanoparticles in drinking water. *Nature Nanotechnology*. 2018;13:661-669. DOI: 10.1038/s41565-018-0217-9.

22. Georgantzopoulou A., Almeida Carvalho P., Vogelsang C., Tilahun M., Ndungu K., Booth A.M., et al. Ecotoxicological effects of transformed silver and titanium dioxide nanoparticles in the effluent from a lab-scale wastewater treatment system. *Environmental Science & Technology*. 2018;52(16):9431-9441. DOI: 10.1021/acs.est.8b01663.
23. Sousa V.S., Teixeira M.R. Metal-based engineered nanoparticles in the drinking water treatment systems: a critical review. *Science of the Total Environment*. 2020;707:136077. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.136077.
24. Shi X., Li Z., Chen W., Qiang L., Xia J., Chen M., et al. Fate of TiO₂ nanoparticles entering sewage treatment plants and bioaccumulation in fish in the receiving streams. *NanoImpact*. 2016;3-4:96-103. DOI: 10.1016/j.impact.2016.09.002.
25. Malakar A., Kanel S.R., Ray C., Snow D.D., Nadagouda M.N. Nanomaterials in the environment, human exposure pathway, and health effects: a review. *Science of the Total Environment*. 2021;759:143470. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.143470.
26. Kang S., Mauter M.S., Elimelech M. Microbial cytotoxicity of carbon-based nanomaterials: implications for river water and wastewater effluent. *Environmental Science & Technology*. 2009;43(7):2648-2653. DOI: 10.1021/es8031506.
27. Savage N., Diallo M.S. Nanomaterials and water purification: opportunities and challenges. *Journal of Nanoparticle Research*. 2005;7:331-342. DOI: 10.1007/s11051-005-7523-5.
28. Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – evidence and impacts. *Waste Management*. 2010;30(3):504-520. DOI: 10.1016/j.wasman.2009.10.012.
29. Hotze E.M., Phenrat T., Lowry G.V. Nanoparticle aggregation: challenges to understanding transport and reactivity in the environment. *Journal of Environmental Quality*. 2010;39(6):1909-1924. DOI: 10.2134/jeq2009.0462.
30. Tirado-Miranda M., Schmitt A., Callejas-Fernández J., Fernández-Barbero A. The aggregation behaviour of protein-coated particles: a light scattering study. *European Biophysics Journal*. 2003;32:128-136. DOI: 10.1007/s00249-002-0275-6.
31. Kiser M.A., Westerhoff P., Benn T., Wang Y., Pérez-Rivera J., Hristovski K. Titanium nanomaterial removal and release from wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology*. 2009;43(17):6757-6763. DOI: 10.1021/es901102n.
32. Gómez-Rivera F., Field J.A., Brown D., Sierra-Alvarez R. Fate of cerium dioxide (CeO₂) nanoparticles in municipal wastewater during activated sludge treatment. *Bioresource Technology*. 2012;108:300-304. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.12.113.
33. Hou L., Li K., Ding Y., Li Y., Chen J., Wu X., et al. Removal of silver nanoparticles in simulated wastewater treatment processes and its impact on COD and NH₄ reduction. *Chemosphere*. 2012;87(3):248-252. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.042.
34. Jeong J.H., Kim S.W., Park T.G. Novel intracellular delivery system of antisense oligonucleotide by self-assembled hybrid micelles composed of DNA/PEG conjugate and cationic fusogenic peptide. *Bioconjugate Chemistry*. 2003;14(2):473-479. DOI: 10.1021/bc025632k.
35. Van der Burgh S., de Keizer A., Cohen Stuart M.A. Complex coacervation core micelles. Colloidal stability and aggregation mechanism. *Langmuir*. 2004;20(4):1073-1084. DOI: 10.1021/la035012n.
36. Kirkegaard P., Hansen S.F., Rygaard M. Potential exposure and treatment efficiency of nanoparticles in water supplies based on wastewater reclamation. *Environmental Science: Nano*. 2015;2:191-202. DOI: 10.1039/C4EN00192C.
37. De Clercq B., Lant P.A., Vanrolleghem P.A. Focused beam reflectance technique for *in situ* particle sizing in wastewater treatment settling tanks. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2004;79(6):610-618. DOI: 10.1002/jctb.1028.
38. Bhatt I., Tripathi B.N. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere*. 2011;82(3):308-317. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.011.
39. Xing Y., Harper Jr. W.F. The effects of engineered nanoparticles on nitrification during biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering*. 2021;118(7):2401-2410. DOI: 10.1002/bit.27746.
40. Parthasarathi V., Thilagavathi G. Synthesis and characterization of titanium dioxide nano-particle and their applications to textiles for microbe resistance. *Journal of Textile, Apparel Technology and Management*. 2009;6(2):1-8.
41. Choi O., Deng K.K., Kim N.-J., Ross Jr. L., Surampalli R.Y., Hu Z.Q. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*. 2008;42(12):3066-3074. DOI: 10.1016/j.watres.2008.02.021.
42. Liang Z., Das A., Hu Z. Bacterial response to a shock load of nanosilver in an activated sludge treatment system. *Water Research*. 2010;44(18):5432-5438. DOI: 10.1016/j.watres.2010.06.060.
43. Yang Y., Quensen J., Mathieu J., Wang Q., Wang J., Li M., et al. Pyrosequencing reveals higher impact of silver nanoparticles than Ag⁺ on the microbial community structure of activated sludge. *Water Research*. 2014;48:317-325. DOI: 10.1016/j.watres.2013.09.046.
44. Kragelund C., Levantesi C., Borger A., Thelen K., Eikelboom D., Tandoi V., et al. Identity, abundance and ecophysiology of filamentous *Chloroflexi* species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*. 2007;59(3):671-682. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00251.x
45. Gao N.T., Limpiyakorn T., Siripattanakul-Ratpukdi S. Inhibition kinetics of ammonia oxidation influenced by silver nanoparticles. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2012;223:5197-5203. DOI: 10.1007/s11270-012-1271-9.
46. Sheng Z., Liu Y. Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. *Water Research*. 2011;45(18):6039-6050. DOI: 10.1016/j.watres.2011.08.065.
47. Siddharth T., Sridhar P., Vinila V., Tyagi R.D. Environmental applications of microbial extracellular polymeric substance (EPS): a review. *Journal of Environmental Management*. 2021;287:112307. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.112307.
48. Luongo L.A., Zhang X. Toxicity of carbon nanotubes to the activated sludge process. *Journal of Hazardous Materials*. 2010;178(1-3):356-362. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.01.087.
49. Dimkpa C.O., Calder A., Gajjar P., Merugu S., Huang W., Britt D.W., et al. Interaction of silver nanoparticles with an environmentally beneficial bacterium, *Pseudomonas*

chlororaphis. *Journal of Hazardous Materials*. 2011;188(1-3): 428-435. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.118.

50. Acosta-Martínez V., Dowd S., Sun Y., Allen V. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology and Biochemistry*. 2008;40(11):2762-2770. DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.07.022.

51. Yazdanbakhsh A.R., Rafiee M., Daraei H., Amoozegar M.A. Responses of flocculated activated sludge to bimetallic Ag-Fe nanoparticles toxicity: Performance, activity enzymatic, and bacterial community shift. *Journal of Hazardous Materials*. 2019;366:114-123. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.11.098.

52. Kragelund C., Levantesi C., Borger A., Thelen K., Eikelboom D., Tandoi V., et al. Identity, abundance and ecophysiology of filamentous bacteria belonging to the *Bacteroidetes* present in activated sludge plants. *Microbiology*. 2008;154(3):886-894. DOI: 10.1099/mic.0.2007/011684-0.

53. Zheng Q., Zhang M., Zhang T., Li X., Zhu M., Wang X. Insights from metagenomic, metatranscriptomic, and molecular ecological network analyses into the effects of chromium nanoparticles on activated sludge system. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 2020;14:60. DOI: 10.1007/s11783-020-1239-8.

54. Daraei H., Rafiee M., Yazdanbakhsh A.R., Amoozegar M.A., Guanglei Q. A comparative study on the toxicity of nano zero valent iron (nZVI) on aerobic granular sludge and flocculent activated sludge: reactor performance, microbial behavior, and mechanism of toxicity. *Process Safety and Environmental Protection*. 2019;129:238-248. DOI: 10.1016/j.psep.2019.07.011.

55. Heylen K., Vanparys B., Peirsegaale F., Lebbe L., De Vos P. *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007;57(9):2056-2061. DOI: 10.1099/ijs.0.65044-0.

56. Cervantes-Avilés P., Augusto Caretta C., Souza Brito E.M., Bertin P., Cuevas-Rodríguez G., Duran R. Changes in bacterial diversity of activated sludge exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Biodegradation*. 2021;32:313-326. DOI: 10.1007/s10532-021-09939-w.

57. Zheng X., Chen Y., Wu R. Long-term effects of titanium dioxide nanoparticles on nitrogen and phosphorus removal from wastewater and bacterial community shift in activated sludge. *Environmental Science & Technology*. 2011;45(17):7284-7290. DOI: 10.1021/es2008598.

58. Seviour R.J., Mino T., Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiology Reviews*. 2003;27(1):99-127. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00021-4.

59. Li K., Qian J., Wang P., Wang C., Fan X., Lu B., et al. Toxicity of three crystalline TiO₂ nanoparticles in activated sludge: bacterial cell death modes differentially weaken sludge dewaterability. *Environmental Science & Technology*. 2019;53(8):4542-4555. DOI: 10.1021/acs.est.8b04991.

60. You Y., Aho K., Lohse K.A., Schwabedissen S.G., Ledbetter R.N., Magnuson T.S. Biological soil crust bacterial communities vary along climatic and shrub cover gradients within a sagebrush steppe ecosystem. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:569791. DOI: 10.3389/fmicb.2021.569791.

fmicb.2021.569791.

61. Cheng Y.-F., Zhang Q., Li G.-F., Xue Y., Zheng X.-P., Cai S., et al. Long-term effects of copper nanoparticles on granule-based denitrification systems: Performance, microbial communities, functional genes and sludge properties. *Bioresource Technology*. 2019;289:121707. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121707.

62. Zheng X., Wu R., Chen Y.G. Effects of ZnO nanoparticles on wastewater biological nitrogen and phosphorus removal. *Environmental Science and Technology*. 2011;45(7):2826-2832. DOI: 10.1021/es2000744.

63. Daraei H., Toolabian K., Thompson I., Qiu G. Bio-toxicity evaluation of zinc oxide nanoparticles on bacterial performance of activated sludge at COD, nitrogen, and phosphorus reduction. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 2022;16:19. DOI: 10.1007/s11783-021-1453-z.

64. Sirelkhatim A., Mahmud S., Seeni A., Kaus N.H.M., Ann L.C., Bakhori S.K.M., et al. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Letters*. 2015;7:219-242. DOI: 10.1007/s40820-015-0040-x.

65. Feng Q., Sun Y., Wu Y., Xue Z., Luo J., Fang F., et al. Physicochemical and biological effects on activated sludge performance and activity recovery of damaged sludge by exposure to CeO₂ nanoparticles in sequencing batch reactors. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019;16(20):4029. DOI: 10.3390/ijerph16204029.

66. Yu R., Fang X., Somasundaran P., Chandran K. Short-term effects of TiO₂, CeO₂, and ZnO nanoparticles on metabolic activities and gene expression of *Nitrosomonas europaea*. *Chemosphere*. 2015;128:207-215. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.02.002.

67. Ma B., Wang S., Li Z., Gao M., Li S., Guo L., et al. Magnetic Fe₃O₄ nanoparticles induced effects on performance and microbial community of activated sludge from a sequencing batch reactor under long-term exposure. *Bioresource Technology*. 2017;225:377-385. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.11.130.

68. Wang S., Li Z., Gao M., She Z., Ma B., Guo L., et al. Long-term effects of cupric oxide nanoparticles (CuO NPs) on the performance, microbial community and enzymatic activity of activated sludge in a sequencing batch reactor. *Journal of Environmental Management*. 2017;187:330-339. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.11.071.

69. Lu H., Oehmen A., Virdis B., Keller J., Yuan Z. Obtaining highly enriched cultures of *Candidatus Accumulibacter phosphatus* through alternating carbon sources. *Water Research*. 2006;40(20):3838-3848. DOI: 10.1016/j.watres.2006.09.004.

70. Xu J.-J., Cheng Y.-F., Jin R.-C. Long-term effects of Fe₃O₄ NPs on the granule-based anaerobic ammonium oxidation process: performance, sludge characteristics and microbial community. *Journal of Hazardous Materials*. 2020;398:122965. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122965.

71. Xu W., Zhao H., Cao H., Zhang Y., Sheng Y., Li T., et al. New insights of enhanced anaerobic degradation of refractory pollutants in coking wastewater: role of zero-valent iron in metagenomic functions. *Journal of Hazardous Materials*. 2020;300:122667. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122667.

72. Wrage N., Velthof G.L., Oenema O., Laanbroek H.J. Acetylene and oxygen as inhibitors of nitrous oxide pro-

duction in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosospira briensis*: a cautionary tale. *FEMS Microbiology Ecology*. 2004;47(1):13-18. DOI: 10.1016/S0168-6496(03)00220-4.

73. Itoi S., Ebihara N., Washio S., Sugita H. Nitrite-oxidizing bacteria, *Nitrospira*, distribution in the outer layer of the biofilm from filter materials of a recirculating water system for the goldfish *Carassius auratus*. *Aquaculture*. 2007;264(1-4):297-308. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.007.

74. Rivas R., Willems A., Subba-Rao N.S., Mateos P.F., Dazzo F.B., Kroppenstedt R.M., et al. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Systematic and Applied Microbiology*. 2003;26(1):47-53. DOI: 10.1078/072320203322337308.

75. Prakash O., Green S.J., Jasrotia P., Overholt W.A., Canion A., Watson D.B., et al. *Rhodanobacter denitrificans* sp. nov., isolated from nitrate-rich zones of a contaminated aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2012;62:2457-2462. DOI: 10.1099/ijs.0.035840-0.

76. Pelevina A.V., Berestovskaya Yu.Yu., Grachev V.A., Dorofeeva I.K., Sorokin V.V., Dorofeev A.G., et al. A microbial consortium removing phosphates under conditions of cyclic aerobic-anaerobic cultivation. *Microbiology*. 2021;90(1):66-77. DOI: 10.1134/S0026261721010082.

77. Dorofeev A.G., Nikolaev Yu.A., Mardanov A.V., Pimenov N.V. Role of phosphate-accumulating bacteria in biological phosphorus removal from wastewater.

Applied Biochemistry and Microbiology. 2020;56:1-14. DOI: 10.1134/S0003683820010056.

78. Zhu Y., Zhang Y., Ren H., Geng J., Xu K., Huang H., et al. Physicochemical characteristics and microbial community evolution of biofilms during the start-up period in a moving bed biofilm reactor. *Bioresource Technology*. 2015;180:345-351. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.01.006.

79. Zeng Q., Xu J., Hou Y., Li H., Du C., Jiang B., et al. Effect of Fe₃O₄ nanoparticles exposure on the treatment efficiency of phenol wastewater and community shifts in SBR system. *Journal of Hazardous Materials*. 2021;407:124828. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124828.

80. Yao C., Lei H.-Y., Yu Q., Li S.-P., Li H., Chen K., et al. Application of magnetic enhanced bio-effect on nitrification: a comparative study of magnetic and non-magnetic carriers. *Water Science & Technology*. 2013;67(6):1280-1287. DOI: 10.2166/wst.2013.697.

81. Chen Y., Su Y., Zheng X., Chen H., Yang H. Alumina nanoparticles-induced effects on wastewater nitrogen and phosphorus removal after short-term and long-term exposure. *Water Research*. 2012;46(14):4379-4386. DOI: 10.1016/j.watres.2012.05.042.

82. Liwarska-Bizukojć E., Olejnik D. Effect of aluminium oxide nano- and microparticles on the functional groups of microorganisms of activated sludge. *Desalination and Water Treatment*. 2020;193:344-351. DOI: 10.5004/dwt.2020.25770.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Стрекаловская Елена Иннокентьевна,

к.б.н.,
ведущий научный сотрудник,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
✉ ivanova.iem@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4216-8859>

Сипкина Евгения Иннокентьевна,

к.х.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
evgiv84@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9220-9765>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena I. Strekalovskaya,

Cand. Sci. (Biology),
Leading Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
Associate Professor,
Irkutsk State University
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
✉ ivanova.iem@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4216-8859>

Evgeniya I. Sipkina,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
evgiv84@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9220-9765>

Вклад авторов

Е.И. Стрекаловская – концептуализация, подбор и обработка имеющихся литературных источников, подготовка иллюстративного материала, написание и редактирование текста статьи.
Е.И. Сипкина – подбор и обработка имеющихся литературных источников, написание и редактирование текста статьи.

Contribution of the authors

Elena I. Strekalovskaya – conceptualization, selection and processing of available literary sources, preparation of illustrative material, writing and editing the text of manuscript.
Evgeniya I. Sipkina – selection and processing of available literary sources, writing and editing the text of the manuscript.

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 25.12.2023.
Одобрена после рецензирования 28.08.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

Information about the article

The article was submitted 25.12.2023.
Approved after reviewing 28.08.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.

Научная статья
УДК 637.144.5
EDN: GEWFBW
DOI: 10.21285/achb.935



Влияние физико-химических факторов на специфическую активность протеаз, применяемых в биотехнологии сыров

Ю.Г. Стурова*✉, А.В. Гришкова******, В.В. Коньшин*, А.Ю. Просеков****

*Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова,
Барнаул, Российская Федерация

**Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия, Барнаул, Российская Федерация

***Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Российская Федерация

****Кемеровский государственный университет, Кемерово, Российская Федерация

Аннотация. В технологии производства сыров важным технологическим звеном является получение сгустка под влиянием протеолитических ферментов. В зависимости от состава молокосвертывающие ферментные препараты по-разному влияют на качественные характеристики сгустка, отделение сыворотки и выход готового продукта. Сегодня на российском рынке представлен широкий ассортимент отечественных и импортных молокосвертывающих ферментных препаратов. В связи с этим выбор коагулянта молока сыродельными предприятиями должен осуществляться в соответствии с тем, сыры какой группы вырабатываются предприятием. На молокосвертывающую активность ферментных препаратов может оказывать влияние активная кислотность смеси, а также температура раствора при приготовлении ферментного препарата, так как она является основным показателем продолжительности свертывания смеси и, следовательно, качества образованного сгустка. Исследование специфической активности молокосвертывающих ферментных препаратов при их приготовлении в рабочем растворе с различной активной кислотностью (рН от 4,0 до 8,0) показало, что при сдвиге активной кислотности в щелочную сторону молокосвертывающая активность всех препаратов значительно снижалась. Применение растворов с рН 4,0 приводило к увеличению молокосвертывающей активности говяжьего пепсина на 94%, сычужно-говяжьего препарата ВНИИМС СГ-50 – на 72%, сычужного фермента – на 36% относительно контроля. Самым чувствительным к колебаниям активной кислотности являлся говяжий пепсин. Исследование влияния температуры субстрата в диапазоне от 30 до 40 °С показало, наибольшей чувствительностью к изменению температуры отличался сычужный фермент. Проведенные исследования показали, что правильно подобранная ферментная композиция является действенным рычагом, влияющим на качество вырабатываемого сыра.

Ключевые слова: молокосвертывающие ферменты, молокосвертывающая активность, термостабильность, ферментативное свертывание, активная кислотность, пепсин, химозин, ферментные композиции

Для цитирования: Стурова Ю.Г., Гришкова А.В., Коньшин В.В., Просеков А.Ю. Влияние физико-химических факторов на специфическую активность протеаз, применяемых в биотехнологии сыров // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 352–361. DOI: 10.21285/achb.935. EDN: GEWFBW.

Influence of physicochemical factors on the specific activity of proteases used in cheesemaking biotechnology

Yuliya G. Sturova*✉, Anastasiya V. Grishkova*****,
Vadim V. Konshin*, Alexander Yu. Prosekov****

*Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russian Federation

**Siberian Research Institute of Cheese Making, Barnaul, Russian Federation

***Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation

****Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. The formation of a clot under the influence of proteolytic enzymes is an essential stage in cheesemaking technology. Depending on their composition, milk-clotting enzyme preparations have a different effect on the quality characteristics of the clot, whey separation, and yield of the finished product. At present, the Russian market offers a wide range of domestic and imported milk-clotting enzyme preparations. In this connection, the choice of a milk coagulant by cheese makers should be carried out in accordance with the cheese group produced by the enterprise. The milk-clotting activity of enzyme preparations depends not only on the active acidity of the mixture, but also on the temperature of the solution used to obtain them. It is the solution temperature that has a determining effect on the duration of the coagulation process and, therefore, the quality of the formed clot. Research into the specific activity of milk-clotting enzyme preparations, obtained in a working solution with different active acidity (pH from 4.0 to 8.0), showed their milk-clotting activity to decrease significantly upon pH shifting to the alkaline region. Application of solutions with a pH of 4.0 led to an increase in the milk-clotting activity of bovine pepsin, VNIIMS SG-50 rennet-bovine preparation, and rennet enzyme by 94, 72, and 36%, respectively, relative to the control. Bovine pepsin demonstrated the highest sensitivity to fluctuations in active acidity. A study into the effect of substrate temperature in the range from 30 to 40 °C established rennet to be the most sensitive preparation to temperature changes. It is concluded that a properly selected enzyme composition is an effective means for affecting the quality of cheese products.

Keywords: milk-clotting enzymes, milk-clotting activity, thermostability, enzymatic coagulation, active acidity, pepsin, chymosin, enzyme compositions

For citation: Sturova Yu.G., Grishkova A.V., Konshin V.V., Prosekov A.Yu. Influence of physicochemical factors on the specific activity of proteases used in cheesemaking biotechnology. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):352-361. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.935. EDN: GEWFBW.

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты являются соединениями белковой природы, которые синтезируются в клетках живых организмов и обладают каталитической активностью, оказывая воздействие на протекание биохимических реакций. Производство ферментных препаратов имеет большое практическое значение, так как их применение, например, в сыродельной отрасли, способствует формированию различных органолептических, реологических и физико-химических показателей продукта. Следует отметить, что они могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на качество получаемого продукта. Ферментативный распад веществ, входящих в состав молока, является важным процессом при формировании основных качественных характеристик продуктов. Для получения различных характеристик в сыроделии активно используют протеазы и липазы, относящиеся к классу гидролаз.

В технологии производства натуральных сыров является важным процесс получения сгустка под влиянием молокосвертывающих ферментов. В зависимости от происхождения молокосвертывающие ферментные

препараты (МФП) по-разному влияют на качественные характеристики сгустка, сырного зерна, отделение сыворотки и выход готового продукта [1–3].

Применяемые МФП оказывают влияние на процесс созревания и формирование органолептических характеристик сыра. После формирования сгустка в сырной массе находится от 6 до 10% используемого фермента, соответственно, под его действием протекают дальнейшие протеолитические реакции, влияющие на формирование таких важных показателей, как вкус и консистенция сыра [4, 5].

Субстратом для МФП является казеин молока при наличии ионов кальция. Следует отметить, что на формирование вырабатываемого сыра важное влияние оказывают и другие компоненты молока – вода, жир, соли, белки сыворотки.

Протеолитические ферменты, применяемые в сыроделии, относятся к кислым протеазам. Их максимальная активность проявляется в кислой среде. Действие химозина направлено на разрыв связи 105 (Phe) – 106 (Met) в молекуле κ-казеина, тогда как пепсин расщепляет белковую молекулу и по другим

пептидным связям. Требование к МФП заключается в том, чтобы они разрывали связь 105 (Phe) – 106 (Met) во много раз быстрее, чем другие связи в протеинах молока [5–9]. Это важно во время выработки сыра, чтобы произошла коагуляция казеина и значительная часть белка не осталась в сыворотке. Высокая неспецифическая протеолитическая активность МФП в процессе свертывания молока нежелательна, так как при этом растворимые продукты протеолиза остаются в сыворотке, снижая тем самым выход сыра, также теряется для сыра и гликомакропептид, отделяемый МФП от молекулы κ -казеина в результате реакции протеолиза. Тем не менее данная реакция является основной при выработке сычужного сыра, поэтому с этим нужно мириться [5, 10–13].

Молокосвертывающая активность МФП может изменяться в зависимости от породы коровы, от которой получено молоко, а также индивидуальной изменчивости состава молока. Все это в целом можно квалифицировать как влияние происхождения и состава молока [4].

На активность МФП оказывают влияние кислотность смеси, вносимых в нее доз заквасочной микрофлоры и хлористого кальция. Это необходимо учитывать при расчете дозы фермента, которая вносится в смесь для образования сгустка хорошего качества в процессе выработки сыра [4–6].

Важную роль играет температура раствора при приготовлении МФП. Она является основным показателем продолжительности свертывания смеси и, следовательно, качества образованного сгустка. Повышение температуры является физическим катализатором при протекании химических реакций, соответственно, при увеличении температуры должна возрастать скорость реакции. В то же время в случае биологических субстратов нужно работать в узком диапазоне температур, поскольку повышение последней может привести к денатурации фермента, в результате чего он потеряет свою активность.

Существует температурный оптимум, при котором ферментные препараты проявляют наибольшую активность. Для МФП животного происхождения он составляет от 35 до 37 °С.

Активность МФП в значительной степени зависит от величины pH, так как ферменты представляют собой коллоидные белковые вещества. Для каждого фермента существует оптимум pH, при котором протеолитическая реакция протекает с максимально высокой скоростью [5, 6, 14].

В практической деятельности важно соблюдать оптимальный температурный режим и поддерживать требуемый уровень pH во время производства или хранения ферментированных молочных продуктов. Так, например, уровень активной кислотности и влажность сырной массы являются важными факторами, определяющими протеолитическую активность МФП, перешедших в состав сырной массы [15].

Оптимум специфической протеолитической активности химозина при гидролизе казеина находится при pH 4, сывороточного альбумина — при pH 3,4. Специфичность гидролиза казеина химозином в высокой степени зависит от уровня pH. Например, при pH 6,8 химозин в молекуле казеина расщепляет одну из 33 связей, а при pH 2,3 — одну из 8. Это объясняется тем, что при

изменении pH молока продолжительность коагуляции зависит не только от активности МФП, но и от электростатических и гидрофобных параметров мицеллы казеина. При снижении активной кислотности молока с 6,8 до 6,0 происходит уменьшение отрицательного заряда молекулы казеина, следствием чего является снижение сил электростатического отталкивания между мицеллами и одновременное усиление гидрофобных взаимодействий. В совокупности это ускоряет образование сгустка при сычужном свертывании [16–18].

Для поддержания активности фермента в молоко, подвергнутое предварительной тепловой обработке и предназначенное для выработки сырного сгустка, вносят хлористый кальций.

Важно отметить, что все существующие традиционные технологии выработки сычужных сыров отрабатывались на применении сычужного фермента. Такие параметры, как температура свертывания молока, качество сгустка, продолжительность вымешивания и температура второго нагревания, отлив сыворотки и внесение воды, время созревания основывались на использовании сычужного фермента. Подбор заквасочной микрофлоры также происходил с учетом их взаимодействия с сычужным ферментом в зависимости от способности использовать образующиеся в результате протеолитической реакции пептиды в качестве субстрата.

Для выработки сыров с низкой температурой второго нагревания в сыроделии стали широко применять смесь севую композицию, содержащую в своем составе 50% химозина и 50% пепсина. Ее применение позволяет производить сыры более высокого качества в данной группе, чем при использовании химозина или пепсина в чистом виде [19, 20].

Применение чистого пепсина негативно влияет на выход сыра, снижая его на более чем на 0,25%, а также на созревание продукта. Первый фактор важен с экономической точки зрения в объемах промышленного производства, второй – с точки зрения формирования органолептических характеристик продукта. Так, короткие пептиды, образующиеся в процессе гидролиза молекулы белка, являются горькими, что влияет на вкус, а широкий протеолиз в целом оказывает влияние на консистенцию (например, формируя порок «мажущая консистенция»). С этим связана рекомендация для сыров с длительными сроками созревания применять МФП с высоким содержанием химозина (не менее 70%) [19, 20].

Целью проведенных исследований являлась оценка молокосвертывающей (специфической) активности МФП с различным качественным составом в зависимости от pH рабочего раствора ферментного препарата и pH молока, а также температуры субстрата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все исследования, необходимые для проведения данной работы, осуществлялись в лаборатории кафедры технологии продуктов питания и Центре комплексных исследований и экспертной оценки пищевой продукции «АлтайБиоЛакт» Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова.

В качестве эталонного образца сравнения применяли Отраслевой контрольный образец сычужного фермента (ОКО СФ) производства ОАО «Московский завод сычужного фермента». Исследовали сычужный

фермент (СФ), сычужно-говяжий препарат (ВНИИМС СГ-50) и говяжий пепсин (ГП) производства ОАО «Московский завод сычужного фермента».

Абсолютную молокосвертывающую активность и соотношение активности пепсина и химозина определяли по ОСТ 10 288-2001.

Готовили 1%-ные растворы исследуемых МФП в дистиллированной воде. Перед исследованием растворы ферментов прогревали при 35 °С в течение 15 мин на водяной бане и охлаждали до комнатной температуры.

Процедура определения молокосвертывающей активности состояла в следующем: 5 мл подготовленного субстрата помещали в стеклянные пробирки, выдерживали в течение 5 мин на водяной бане при температуре 35 °С, добавляли 0,1 мл исследуемого ферментного препарата, затем включали секундомер и тщательно перемешивали содержимое пробирки.

Начало реакции коагуляции определяли по образованию хлопьев в капле молока, наносимой на стенки пробирки стеклянной палочкой.

При подготовке субстрата сырое сборное непастеризованное молоко нагревали на водяной бане до температуры 72 °С и выдерживали при этой температуре в течение 10 мин, затем быстро охлаждали в проточной воде до температуры (22±2) °С. В охлажденное молоко вносили хлористый кальций до конечной концентрации 3 мМ. При необходимости активную кислотность молока доводили до 6,5 ед. рН раствором 1,0 М НСl. Подготовленное таким образом молоко использовали для дальнейших исследований.

Расчет молокосвертывающей активности производился по формуле

$$MA = \frac{A}{T_1 \times T_2},$$

где А – аттестованная молокосвертывающая активность ОКО СФ в условных единицах на 0,1 г; T_1 – время свертывания с ОКО СФ; T_2 – время свертывания с исследуемым образцом.

В исследованиях применялись ацетатный (рН 3,7–5,6) и фосфатный (рН 5,8–8,0) буферные растворы. Все использованные в работе реактивы имели квалификацию «ч.д.а.» или «х.ч.».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

МФП играют двойную роль в процессе выработки сыра: специфическая активность определяет скорость и качество образуемого сгустка, а неспецифическая (протеолитическая активность) – процесс созревания и формирования качественных характеристик продукта.

На первом этапе исследований у всех образцов МФП была определена молокосвертывающая активность при стандартных условиях. Результаты представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что уровень молокосвертывающей активности исследуемых образцов МФП соответствует декларируемой. Кроме того, у натуральных заменителей СФ животного происхождения важно оценивать качественный состав, который подразумевает соотношение основных ферментных компонентов – говяжьего пепсина и химозина. Эти показатели также являются декларируемыми величинами.

Результаты исследования представлены на рис. 1. Из рис. 1 видно, что фактическое содержание химозина

Таблица 1. Молокосвертывающая активность образцов ферментных препаратов

Table 1. Milk-clotting activity of enzyme samples

Наименование препарата	Молокосвертывающая активность, усл.ед./г	
	декларируемая	фактическая
СФ	110000±5000	114512
ВНИИМС СГ-50	110000±5000	111650
ГП	110000±5000	110000

в препарате СФ больше на 19% по сравнению со средним значением декларируемого показателя (химозин ≤ 70, пепсин ≥ 30). В препарате ВНИИМС СГ-50 доля пепсина выше декларируемой величины на 7% (химозин = 50, пепсин = 50). Препарат ГП содержал в своем составе 15% химозина. Следует отметить, что качественный состав отечественных препаратов может быть нестабильным, но тем не менее удовлетворяет требованиям, предъявляемым сыродельным производством [3, 19, 20].

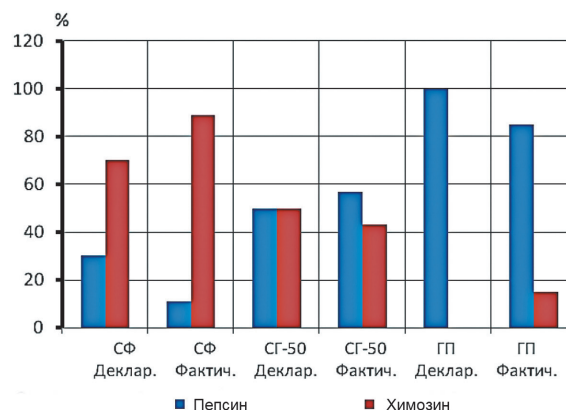


Рис. 1. Состав молокосвертывающих ферментных препаратов

Fig. 1. Composition of milk-converting enzyme preparations

В результате проведенных исследований выявлено, что большей величиной молокосвертывающей активности обладал СФ. Данный результат может быть обусловлен погрешностью выполнения метода измерений. Также это может быть связано с тем, что СФ содержит наибольшее количество химозина, оптимум действия которого приближен к стандартным условиям свертывания молока: рН 6,5 усл.ед., 35 °С. Кроме того, колебания активности препаратов могут изменяться в зависимости от кислотности, качества и состава перерабатываемого молока, от количества внесенного хлористого кальция. Данная информация на сыродельных предприятиях может способствовать наиболее оптимальному расходу препаратов [12, 16, 18].

Активная кислотность (рН) раствора МФП влияет на их активность. Каждый фермент проявляет свою максимальную активность в узком диапазоне, при этом сдвиг рН среды может снижать уровень молокосвертывающей активности ферментов. Поэтому рН раствора МФП является важным показателем.

На рис. 2 приведен график зависимости уровня молокосвертывающей активности ферментного пре-

парата от уровня активной кислотности раствора при изменении активной кислотности буферных растворов от 4,0 до 8,0 усл.ед. с дискретностью 1,0 усл.ед. По результатам исследования видно, что специфическая (молокосвертывающая) активность исследованных ферментных препаратов, приготовленных в растворе с рН 7,0 ед., находилась приблизительно на одном уровне. Сдвиг кислотности в кислую или щелочную сторону способствовал, соответственно, увеличению или снижению молокосвертывающей активности МФП.

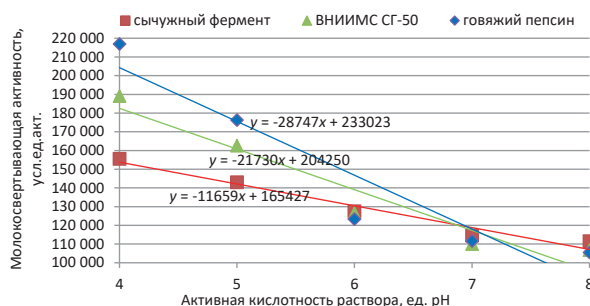


Рис. 2. Зависимость уровня молокосвертывающей активности ферментного препарата от уровня активной кислотности водного раствора

Fig. 2. Relationship between milk-clotting activity level of enzyme preparation and active acidity level of aqueous solution

Наиболее высокая активность была присуща ферментным препаратам, рН раствора которых лежал в диапазоне от 4,0 до 5,0 ед. С увеличением доли пепсина в составе МФП активность фермента росла при значении рН 4,0. При сдвиге рН в щелочную сторону молокосвертывающая активность всех препаратов значительно снижалась. Так, при снижении активной кислотности от 7,0 до 8,0 ед. рН молокосвертывающая активность ГП уменьшалась на 5,4%, ВНИИМС СГ-50 – на 2,8%, СФ – на 2,6% относительно контроля. Применение растворов с рН 4,0 ед. приводило к увеличению молокосвертывающей активности ГП на 94%, ВНИИМС СГ-50 – на 72%, СФ – на 36% относительно контроля. Это объясняется тем, что оптимумом действия всех МФП, как было сказано выше, является кислая среда, а в щелочной они начинают терять свою активность. Следует отметить, что при этом активность МФП остается в пределах нормы [12, 16, 18].

Из приведенных на рис. 2 результатов исследований можно заключить, что МФП с увеличением доли пепсина становятся более чувствительными к изменениям рН раствора. Так, в случае СФ при снижении рН до 5,0 ед. происходило увеличение молокосвертывающей активности на 25%, а при увеличении рН до 8,0 ед. – снижение на 2,5%. При этом молокосвертывающая активность ГП при рН 5,0 ед. возрастала на 58%, а при рН 8,0 ед. снижалась на 5,4%.

Полученные данные можно применить в практической деятельности. Так, на большинстве сыродельных предприятий для приготовления растворов МФП применяют пастеризованную водопроводную воду, уровень рН которой приближается к значению 8,0 ед. Как было сказано выше, при таких значениях активной кислот-

ности раствора молокосвертывающая активность МФП уменьшается. Это в свое время ведет к излишнему расходу препарата, что экономически нецелесообразно, а также отрицательно влияет на процесс выработки, обуславливая получение рыхлого сгустка, и приводит к порокам вкуса (горького, салостого).

Влияние концентрации ионов водорода в субстрате на продолжительность свертывания представлено на рис. 3. При снижении активной кислотности молока продолжительность образования сгустка зависит не только от молокосвертывающей активности МФП, но и от электростатических и гидрофобных характеристик мицеллы к-казеина. При низких значениях рН молока происходит снижение отрицательного заряда молекулы белка. Это приводит к снижению сил электростатического отталкивания между мицеллами, одновременно усиливает казеин-казеиновые гидрофобные взаимодействия и ускоряет образование сгустка при сычужном свертывании молока. Напротив, увеличение рН молока приводит к более длительному процессу свертывания молока всеми ферментами, что видно из рис. 3. Важно отметить, что СФ является более стабильным при данных изменениях рН: продолжительность свертывания смеси в диапазоне активной кислотности от 5,0 до 8,0 ед. изменилась от 152 до 207 с. Самым чувствительным к колебаниям активной кислотности является ГП: продолжительность свертывания смеси в указанном диапазоне рН изменилась от 109 до 224 с.

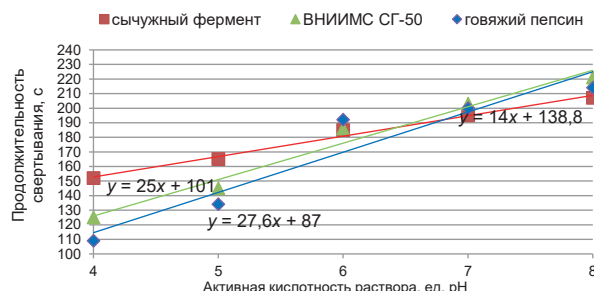


Рис. 3. Влияние концентрации ионов водорода на продолжительность свертывания молока под действием ферментных препаратов

Fig. 3. Effect of hydrogen ion concentration on the duration of milk coagulation under the action of enzyme preparations

Для успешного применения МФП в производстве важно не только учитывать молокосвертывающую активность, заключающуюся в специфической реакции отщепления гликомакропептида от молекулы к-казеина, и неспецифическую протеолитическую активность, характеризующуюся непрерывным расщеплением казеина во времени, что может стать причиной снижения качества вырабатываемого сыра, но и контролировать термостабильность ферментных препаратов. Термостабильность МФП оказывает большое влияние на протеолиз и является одним из основных регуляторов интенсивности и направленности первичных протеолитических реакций при созревании сыра. Результаты исследования этого параметра показали, что в зависимости от качественного состава МФП имеют различную устойчивость к воздействию температуры.

График изменения уровня молокосвертывающей

активности ферментных препаратов при изменении температуры молока в качестве субстрата с внесением всех компонентов, применяемых при выработке сыра, от 30 до 40 °С с шагом в 5 °С приведен на рис. 4, а изменение продолжительности свертывания молока при нарастании температуры инкубирования субстрата представлено на рис. 5.

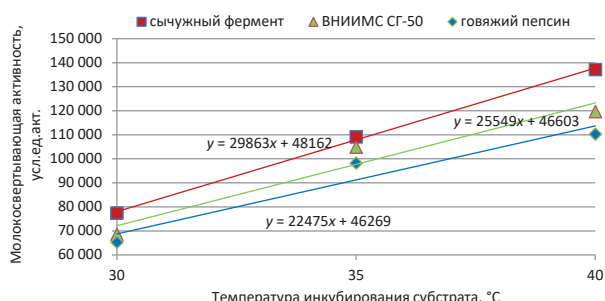


Рис. 4. Изменение уровня молокосвертывающей активности ферментных препаратов при увеличении температуры инкубирования субстрата

Fig. 4. Changes of milk-clotting activity of enzyme preparations versus incubation temperature of the substrate

Наибольшей чувствительностью к изменению температуры отличался СФ. Значительные колебания молокосвертывающей активности наблюдались при повышении температуры с 30 до 35 °С. ВНИИМС СГ-50 увеличил свертывающую активность в этом диапазоне на 34,6%, ГП – на 33,5%, а СФ – на 29%. С повышением температуры инкубирования субстрата молокосвертывающая активность ферментных препаратов нарастает, достигая наибольших значений при 40 °С.

Температура молока является важным параметром, влияющим на свойства сгустка. Оптимальным для получения плотного, не образующего сырной пыли сгустка

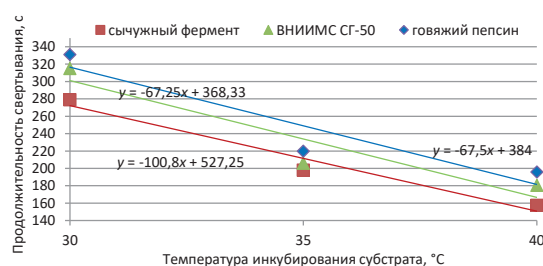


Рис. 5. Влияние температуры субстрата на продолжительность свертывания под действием ферментных препаратов

Fig. 5. Effect of substrate temperature on the duration of coagulation under the action of enzyme preparations

в сыроделии является диапазон от 33 до 35 °С. Повышение температуры до 40 °С приводит к получению у сгустка резиновой консистенции, поскольку сырное зерно преждевременно приобретает оболочку, следствием чего является плохое отделение сыворотки. Это, в свою очередь, может негативно отразиться на созревании полученного сыра и на формировании его органолептических характеристик [19].

Отдельный интерес представляла оценка качества сгустка и скорости его образования с применением изученных МФП. Для этого в условиях лаборатории был смоделирован процесс выработки сыра с низкой температурой второго нагревания. Физико-химические показатели молочной смеси для проведения эксперимента и основные вносимые компоненты представлены в табл. 2.

Все факторы, которые необходимо учитывать при формировании сгустка, образующегося вод воздействием МФП, были максимально приближены к единому значению: температура свертывания составляла 35 °С,

Таблица 2. Физико-химические показатели молочной смеси

Table 2. Physico-chemical parameters of the milk mixture

Показатели смеси	Смесь с СФ	Смесь с ВНИИМС СГ-50	Смесь с ГП
Смесь:			
жир, %		2,9±0,07	
кислотность, °Т		17±0,5	
Внесено на 100 л:			
KNO ₃ , г		20±0,65	
CaCl ₂ , г		35±0,45	
БК Алтай С, %		1,0±0,1	
Кислотность перед свертыванием, °Т	20±0,5	20±0,5	20±0,5
pH	6,46±0,01	6,45±0,01	6,47±0,01
МФП внесено на 100 л смеси:			
СФ 70/30	2,25	–	–
ВНИИМС СГ-50	–	2,25	–
ГП	–	–	2,25
Температура свертывания, °С	35		
Продолжительность, мин:			
свертывания	29	32	34
обработки до второго нагревания (включая разрезку сгустка и отлив сыворотки)	30	30	30

Таблица 3. Органолептические показатели сычужного сгустка

Table 3. Organoleptic parameters of the rennet

Показатель	СФ	ВНИИМС СГ-50	ГП
Структура сгустка	Очень плотный сгусток с четкими границами, без образования хлопьев белка, отлично отделяет сыворотку светло-зеленого цвета	Плотный сгусток с ровными краями, без образования хлопьев белка, хорошо отделяет сыворотку светло-зеленого цвета	Менее плотный сгусток с ровными краями, без образования хлопьев белка, хорошо отделяет сыворотку светло-зеленого цвета
Бальная оценка	5	5	4

кислотность смеси – $(6,46 \pm 0,1)$ ед. рН. Растворы МФП, вносимые в модельные смеси, были приготовлены с применением буферного раствора с активной кислотностью 6,0 ед. рН, оптимальной по результатам проведенных исследований. Процесс образования сгустка во всех образцах протекал активно. Сгусток был плотный, хорошо отделялся от краев, на изломе давал ровные края с выделением прозрачной сыворотки. Зерно равномерно уплотнялось и обсыхало, имело необходимую упругость.

Анализ полученных с помощью секундомера данных показал, что продолжительность свертывания понижалась в ряду ГП > ВНИИМС СГ-50 > СФ. Скорость образования сгустка с применением СФ была максимальной (29 мин) по сравнению с препаратами ВНИИМС СГ-50 (32 мин) и ГП (34 мин), что соответствует допустимым пределам. Согласно нормативной документации на производство полутвердых сыров с низкой температурой второго нагревания, данная величина должна составлять (30 ± 5) мин. Это можно объяснить различным содержанием химозина и пепсина в исследуемых МФП. Химозин синтезируется для обеспечения свертывания молока и поэтому гидролизует ключевую пептидную связь 105 (Phe) – 106 (Met) с образованием крупных фрагментов в отличие от пепсина, атакующего большое количество пептидных связей, как в казеине, так и в белках, поступающих с твердыми кормами [20].

Кроме того, ГП, содержащий в своем составе 85% активности пепсина от общей молокосвертывающей активности МФП, обладает гораздо более высокой протеолитической активностью по сравнению с химозином, гидролизует белки с образованием коротких пептидов, что увеличивает время образования и снижает прочность образования сгустка [3, 16, 17, 20].

Также представляла интерес оценка органолептических показателей полученных сгустков (табл. 3).

Качество сгустка оценивали по пятибалльной шкале. Первые два образца (с применением СФ и ВНИИМС СГ-50) получили наивысший балл, потому что структура сгустка соответствовала требованиям для сыроделия, третий же образец отличался пониженной плотностью сгустка, поэтому ему присвоена оценка 4. Показатели оценки можно объяснить различным содержанием химозина в трех образцах, первый и второй образец обладают большим его содержанием (89 и 57% соответственно), что способствует получению более плотного, однородного сгустка.

Подводя итог, можно сделать вывод, что наилучшие сгустки получались при использовании СФ и ВНИИМС СГ-50. Они образовались с наибольшей скоростью, также обладали большей плотностью, твердостью и упругостью. Следовательно, при выработке сыра с

применением этих ферментов можно будет снизить потери белка и жира с сывороткой в отличие от применения ГП. Это является важным моментом с точки зрения экономики предприятия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важнейшей задачей сегодняшнего дня для производителей является равномерная в течение всего года работа и круглогодичная поставка на рынок продукции таким образом, чтобы при этом создавались еще и резервы на межсезонный период. Эта задача выполнима при условии применения рычагов регулирования процесса созревания сыров. В частности, выполнение данной задачи можно решить при использовании в выработке сыров композиций ферментных препаратов разного состава.

Качественный состав (соотношение пепсина и химозина) молокосвертывающих ферментов позволит оказывать влияние на длительность процесса созревания сыра, направленно влиять на формирование органолептических характеристик продукта. На активность самих ферментов можно влиять с помощью физическо-химических факторов, например таких, как активная кислотность раствора и температура.

Как показали результаты исследований, МФП с большей долей пепсина в составе проявили большую чувствительность к изменениям рН раствора.

Исследование специфической активности МФП при их приготовлении в рабочем растворе с различной активной кислотностью (рН от 4,0 до 8,0 ед.) показало, что при сдвиге активной кислотности в щелочную сторону молокосвертывающая активность всех препаратов значительно снижалась. Применение растворов с рН 4,0 ед. приводило к увеличению молокосвертывающей активности ГП на 94%, ВНИИМС СГ-50 – на 72%, СФ – на 36% относительно контроля.

Изучение молокосвертывающей активности МФП в зависимости от рН молока (рассматриваемый диапазон от 5,0 до 8,0 ед. рН) показало, что СФ являлся более стабильным при данных изменениях рН. Самым чувствительным к колебаниям активной кислотности являлся ГП.

Исследование влияния температуры субстрата (диапазон значений от 30 до 40 °С) на молокосвертывающую активность МФП показало, наибольшей чувствительностью к изменению температуры отличался СФ.

Оптимальный качественный состав МФП является действенным рычагом, влияющим на качество вырабатываемого сыра, поскольку МФП влияет на качество сгустка, постановку и формирование сырного зерна, отделение сыворотки, регулирует первичные процессы протеолиза и созревание сыра.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kumar A., Sasmal S. Rheological and physico-chemical properties of milk gel using isolate of pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds: a new source of milk clotting peptidase // *Food Hydrocolloids*. 2020. Vol. 106. P. 105866. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.105866.
2. Beltrán-Espinoza J.A., Domínguez-Lujan B., Gutiérrez-Méndez N., Chávez-Garay D.R., Nájera-Domínguez C., Leal-Ramos M.Y. The impact of chymosin and plant-derived proteases on the acid-induced gelation of milk // *International Journal of Dairy Technology*. 2021. Vol. 74, no. 2. P. 297–306. DOI: 10.1111/1471-0307.12760.
3. Myagkonosov D.S., Smykov I.T., Abramov D.V., Delitskaya I.N., Ovchinnikova E.G. Influence of different milk-clotting enzymes on the process of producing semihard cheeses // *Пищевые системы*. 2023. Т. 6. N 1. С. 103–116. DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-103-116. EDN: DPMPUF.
4. Мурунова Г.В., Муничева Т.Э., Калинина Г.Е. «Нестандартность» поведения молокозвертывающих ферментов // *Сыроделие и маслоделие*. 2012. N 6. С. 28–29. EDN: PJOIZD.
5. Гришкова А.В., Просеков А.Ю., Коваль А.Д. Технологические свойства препаратов сычужного фермента // *Сыроделие и маслоделие*. 2023. N 4. С. 56–60. DOI: 10.21603/2073-4018-2023-4-9. EDN: ITJFHF.
6. Стурова Ю.Г., Кригер А.В., Жидких К.В. Факторы, влияющие на активность ферментных препаратов животного происхождения // *Сыроделие и маслоделие*. 2014. N 3. С. 47–49. EDN: QHQC RD.
7. Мордвинова В.А., Абрамов Д.В., Мяконосов Д.С., Овчинникова Е.Г., Муничева Т.Э. Особенности применения микробных МФП в сыроделии // *Научные подходы к решению актуальных вопросов в области переработки молока: сб. науч. тр. к 75-летию со дня основания ВНИИМС*. Углич: Изд-во ВНИИМС, 2019. С. 71–83. EDN: KUNHWN.
8. Nicosia F.D., Puglisi I., Pino A., Caggia C., Randazzo C.L. Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking // *Foods*. 2022. Vol. 11, no. 6. P. 871. DOI: 10.3390/foods11060871.
9. Rajagopalan A., Aluru V., Sukumaran B.O. Characterisation of hydrolysate for identifying initial peptide cleavage site of κ -casein by milk coagulating *Wrightia tinctoria* serine proteases // *International Dairy Journal*. 2021. Vol. 115. P. 104934. DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104934.
10. Saxena S., Sasmal S. Bio-prospecting of waste vegetable resources for isolation of milk clotting proteases // *Journal of the Institution of Engineers (India): Series E*. 2021. Vol. 102. P. 293–298. DOI: 10.1007/s40034-021-00220-6.
11. Zhang X., Tao L., Wei G., Yang M., Wang Z., Shi C., et al. Plant-derived rennet: research progress, novel strategies for their isolation, identification, mechanism, bioactive peptide generation, and application in cheese manufacturing // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023. P. 1–13. DOI: 10.1080/10408398.2023.2275295.
12. 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 *Irpe lacteus* (*Irpe lacteus* (Fr.) Fr.) // *Foods and Raw Materials*. 2016. Vol. 4, no. 2. P. 58–65. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-2-58-65.
13. Бельнская С.В., Рудометов А.П., Щербаков Д.Н., Балабова Д.В., Кригер А.В., Белов А.Н. [и др.]. Некоторые биохимические свойства рекомбинантного химозина альпака (*Vicugna pacos* L.) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018. Т. 54. N 6. С. 585–593. DOI: 10.1134/S0555109918060053. EDN: TNYGNK.
14. Китаевская С.В., Решетник О.А. Влияние низкотемпературной обработки на активность протеолитических ферментов различных видов муки // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 3. С. 439–449. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-439-449. EDN: CTCQZX.
15. Мяконосов Д.С., Абрамов Д.В., Делицкая И.Н., Овчинникова Е.Г. Протеолитическая активность молокозвертывающих ферментов разного происхождения // *Пищевые системы*. 2022. Т. 5. N 1. С. 47–54. DOI: 10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54. EDN: FKAQJB.
16. Лепилкина О.В., Григорьева А.И. Ферментативный протеолиз при образовании молока в сыр // *Пищевые системы*. 2023. Т. 6. N 1. С. 36–45. DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-36-45. EDN: MYSJFF.
17. Тёпел А. Химия и физика молока / пер. с нем. СПб.: Профессия, 2012. 813 с.
18. Милентьева И.С., Давыденко Н.И., Расщепкин А.Н. Подбор рабочих параметров для проведения направленного протеолиза казеина с целью получения биопептидов // *Техника и технология пищевых производств*. 2020. Т. 50. N 4. С. 726–735. DOI: 10.21603/2074-9414-2020-4-726-735. EDN: AELHQJ.
19. Белов А.Н., Кригер А.В., Коваль А.Д., Миклишанский В.А. Формирование органолептических показателей сыров и управление процессом созревания // *Сыроделие и маслоделие*. 2018. N 4. С. 36–38. DOI: 10.31515/2073-4018-2018-4-36-38. EDN: UVCQXH.
20. Кригер А.В., Белов А.Н., Коваль А.Д. Интенсификация процесса созревания сыров и улучшение их качества // *Сыроделие и маслоделие*. 2019. N 4. С. 24–26. EDN: AKDBDN.

REFERENCES

1. Kumar A., Sasmal S. Rheological and physico-chemical properties of milk gel using isolate of pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds: a new source of milk clotting peptidase. *Food Hydrocolloids*. 2020;106:105866. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.105866.
2. Beltrán-Espinoza J.A., Domínguez-Lujan B., Gutiérrez-Méndez N., Chávez-Garay D.R., Nájera-Domínguez C., Leal-Ramos M.Y. The impact of chymosin and plant-derived proteases on the acid-induced gelation of milk. *International Journal of Dairy Technology*. 2021;74(2):297-306. DOI: 10.1111/1471-0307.12760.
3. Myagkonosov D.S., Smykov I.T., Abramov D.V., Delitskaya I.N., Ovchinnikova E.G. Influence of different milk-clotting enzymes on the process of producing semihard cheeses. *Food Systems*. 2023;6(1):103-116. DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-103-116. EDN: DPMPUF.
4. Murunova G.V., Munchieva T.E., Kalinina G.E. "Non-standard" behavior of milk-converting enzymes. *Cheese- and buttermaking*. 2012;6:28-29. (In Russian). EDN: PJOIZD.
5. Grishkova A.V., Prosekov A.Yu., Koval A.D. The main technological properties of rennet enzyme preparations. *Cheese- and buttermaking*. 2023;4:56-60. (In Russian). DOI: 10.21603/2073-4018-2023-4-9. EDN: ITJFHF.

6. Sturova Yu.G., Kriger A.V., Jydkih K.V. Factors effecting activity of the enzymes preparations of the animal origin. *Cheese- and buttermaking*. 2014;3:47-49. (In Russian). EDN: HQQCRD.

7. Mordvinova V.A., Abramov D.V., Myagkonosov D.S., Ovchinnikova E.G., Municheva T.E. Features of the use of microbial milk-clotting enzyme preparation in cheese making. In: *Nauchnye podkhody k resheniyu aktual'nykh voprosov v oblasti pererabotki moloka: sb. nauch. tr. k 75-letiyu so dnya osnovaniya VNIIMS = Scientific approaches to solving topical issues in milk processing: a collection of scientific papers on the 75th anniversary of the founding of VNIIMS*. Uglich: All-Russian Scientific Research Institute of Butter and Cheese Making; 2019, p. 71-83. (In Russian).

8. Nicosia F.D., Puglisi I., Pino A., Caggia C., Randazzo C.L. Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. *Foods*. 2022;11(6):871. DOI: 10.3390/foods11060871.

9. Rajagopalan A., Aluru V., Sukumaran B.O. Characterisation of hydrolysate for identifying initial peptide cleavage site of κ -casein by milk coagulating *Wrightia tinctoria* serine proteases. *International Dairy Journal*. 2021;115:104934. DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104934.

10. Saxena S., Sasmal S. Bio-prospecting of waste vegetable resources for isolation of milk clotting proteases. *Journal of the Institution of Engineers (India): Series E*. 2021;102:293-298. DOI: 10.1007/s40034-021-00220-6.

11. Zhang X., Tao L., Wei G., Yang M., Wang Z., Shi C., et al. Plant-derived rennet: research progress, novel strategies for their isolation, identification, mechanism, bioactive peptide generation, and application in cheese manufacturing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023;1-13. DOI: 10.1080/10408398.2023.2275295.

12. 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. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-2-58-65.

13. Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., et al. Biochemical properties of recombinant chymosin in alpaca (*Vicugna pacos* L.). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2018;54(6):585-593. DOI: 10.1134/S0555109918060053. EDN: TNYGHK.

14. Kitaevskaya S.V., Reshetnik O.A. Effects of low-temperature treatment on the activity of proteolytic enzymes in various flour types. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):439-449. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-439-449. EDN: CTCQZX.

15. Myagkonosov D.S., Abramov D.V., Delitskaya I.N., Ovchinnikova E.G. Proteolytic activity of milk-clotting enzymes of different origin. *Food systems*. 2022;5(1):47-54. (In Russian). DOI: 10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54. EDN: FKAQJB.

16. Lepilkina O.V., Grigorieva A.I. Enzymatic proteolysis during the conversion of milk into cheese. *Food systems*. 2023;6(1):36-45. (In Russian). DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-36-45. EDN: MYSJFF.

17. Tepel A. Chemistry and physics of milk; 1976, 472 p. (Russ. ed.: *Khimiya i fizika moloka*. St. Petersburg: Profession; 2012, 813 p.).

18. Milenteva I.S., Davydenko N.I., Rasshchepkin A.N. Casein proteolysis in bioactive peptide production: optimal operating parameters. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2020;50(4):726-735. (In Russian). DOI: 10.21603/2074-9414-2020-4-726-735. EDN: AELHJQ.

19. Belov A.N., Kriger A.V., Koval' A.D., Miklishanskii V.A. Formation of the organoleptic properties of cheese and control of cheese ripening process. *Cheese- and buttermaking*. 2018;4:36-38. (In Russian). DOI: 10.31515/2073-4018-2018-4-36-38. EDN: UVCQXH.

20. Kriger A.V., Belov A.N., Koval' A.D. Intensification of the cheese ripening process and improvement of cheese quality. *Cheese- and buttermaking*. 2019;4:24-26. (In Russian). EDN: AKDBDN.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Стурова Юлия Геннадьевна,

к.т.н., доцент,
Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
✉ y_sturova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4492-6628>

Гришкова Анастасия Викторовна,

к.т.н., доцент,
старший научный сотрудник,
Сибирский научно-исследовательский
институт сыродоления,
656016, г. Барнаул, ул. Советской армии, 66,
Российская Федерация,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yuliy G. Sturova,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Polzunov Altai State Technical University,
46, Lenin Ave., Barnaul, 656038,
Russian Federation,
✉ y_sturova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4492-6628>

Anastasiya V. Grishkova,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Senior Researcher,
Siberian Research Institute of Cheese Making,
66, Sovetskoi Armii St., Barnaul, 656016,
Russian Federation,

доцент,
Алтайский государственный
медицинский университет,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40,
Российская Федерация,
anastasiya-kriger@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1117-0489>

Коньшин Вадим Владимирович,
д.х.н., доцент, заведующий кафедрой,
Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
vadandral@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9335-1824>

Просеков Александр Юрьевич,
д.т.н., профессор, главный научный сотрудник,
Кемеровский государственный университет,
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,
Российская Федерация,
rector@kemsu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5630-3196>

Вклад авторов

Ю.Г. Стурова – разработка концепции
исследования, проведение экспериментов,
обработка полученных данных,
осуществление расчетов, подготовка
иллюстративного материала.
А.В. Гришкова – обработка полученных
данных, осуществление расчетов,
написание текста статьи.
В.В. Коньшин – обсуждение результатов.
А.Ю. Просеков – обсуждение результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 18.02.2024.
Одобрена после рецензирования 04.08.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

Associate Professor,
Altai State Medical University,
40, Lenin Ave., Barnaul, 656038,
Russian Federation,
anastasiya-kriger@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1117-0489>

Vadim V. Konshin,
Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Head of the Department,
Altai State Technical University,
46, Lenin Ave, Barnaul, 656038,
Russian Federation,
vadandral@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9335-1824>

Alexander Yu. Prosekov,
Dr. Sci. (Engineering), Professor, Chief Researcher,
Kemerovo State University,
6, Krasnaya St., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
rector@kemsu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5630-3196>

Contribution of the authors

Yuliya G. Sturova – research concept
development, conducting experiments,
processing the data obtained, calculations,
preparing illustrative material.
Anastasiya V. Grishkova – processing the data,
calculations, writing the text of manuscript.
Vadim V. Konshin – results discussion.
Alexander Yu. Prosekov – results discussion.

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 18.02.2024.
Approved after reviewing 04.08.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.



Оценка стабильности фикобилипротеинов оптическим методом при их хранении в водно-спиртовом растворе

И.Н. Гудвилевич✉, А.Б. Боровков

Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Российская Федерация

Аннотация. Целью работы являлась оценка стабильности пигментов, относящихся к группе фикобилипротеинов, выделенных из биомассы цианобактерии *Spirulina (Arthrospira) platensis* и красной микроводоросли *Porphyridium purpureum*. Водные экстракты фикобилипротеинов получали после двукратного замораживания сырой биомассы *Arthrospira platensis* и *Porphyridium purpureum*, экстракцию проводили фосфатным буфером (0,05 М, pH = 7) на холоде (5 °С) в течение 24 часов. К полученным экстрактам добавляли 96%-й этанол до его концентрации в растворе 20%. Хранение водно-спиртовых экстрактов фикобилипротеинов осуществляли 3 месяца, контроль концентраций пигментов проводили оптическим методом. Наибольшую стабильность при хранении продемонстрировал пигмент аллофикоцианин. Самая высокая скорость деградации фикобилипротеинов наблюдалась при их хранении на свету при комнатной температуре. Скорость деградации пигментов в этих условиях в 9 и в 80 раз (для В-фикоэритрина и С-фикоцианина соответственно) превышала аналогичные показатели при их хранении в темноте и на холоде. Наименее стойким, по сравнению с другими исследованными фикобилипротеинами, оказался С-фикоцианин. Скорость его деградации при всех вариантах хранения была от 5 до 10 раз выше, чем В-фикоэритрина в аналогичных условиях. Обязательным условием сохранения С-фикоцианина и В-фикоэритрина в водно-спиртовых растворах являлось отсутствие света, а в случае С-фикоцианина и пониженная температура. Допустимо также хранение В-фикоэритрина в темноте при комнатной температуре. Такой режим может обеспечить сохранность до 86% пигментов в водно-спиртовых растворах на протяжении 25–30 суток.

Ключевые слова: фикобилипротеины, С-фикоцианин, В-фикоэритрин, скорость деградации, *Spirulina platensis*, *Porphyridium purpureum*

Финансирование. Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда «Разработка научного обоснования промышленного производства функциональных продуктов питания, включающих экстракты микроводоросли порфиридиум» (№ 24-26-20131).

Для цитирования: Гудвилевич И.Н., Боровков А.Б. Оценка стабильности фикобилипротеинов оптическим методом при их хранении в водно-спиртовом растворе // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 362–370. DOI: 10.21285/achb.927. EDN: TQPEED.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Storage stability of phycobiliproteins in a hydroalcoholic solution evaluated by an optical method

Irina N. Gudvilovich✉, Andrei B. Borovkov

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, RAS, Sevastopol, Russian Federation

Abstract. The aim was to evaluate the stability of pigments of the phycobiliprotein group extracted from the biomass of the *Spirulina (Arthrospira) platensis* cyanobacterium and the *Porphyridium purpureum* red microalgae. Water

extracts of phycobiliproteins were obtained following a double freezing of the raw biomass of *Arthrospira platensis* and *Porphyridium purpureum*. An extraction was carried out with a phosphate buffer (0.05 M, pH = 7) in the cold (5 °C) for 24 hours. To the extracts obtained, 96% ethanol was added until its concentration in the solution was 20%. The hydroalcoholic extracts of phycobiliproteins were stored for three months. Pigment concentrations were monitored by an optical method. The allophycocyanin pigment demonstrated the highest storage stability. The highest degradation rate of phycobiliproteins was observed during their storage in the light at room temperature. The degradation rate of pigments under these conditions was 9- and 80-fold higher (for B-phycoerythrin and C-phycoerythrin, respectively) than similar indices during their storage in the dark and in the cold. C-phycoerythrin was the least stable, compared to other studied phycobiliproteins. Its degradation rate under all storage options was 5- to 10-fold higher than that of B-phycoerythrin under similar conditions. An essential conservation requirement for C-phycoerythrin and B-phycoerythrin in hydroalcoholic solutions was the absence of light. For C-phycoerythrin, a low temperature was necessary as well. Storage of B-phycoerythrin in the dark at room temperature is acceptable. These conditions can ensure the conservation of up to 86% of pigments in hydroalcoholic solutions for 25–30 days.

Keywords: phycobiliproteins, C-phycoerythrin, B-phycoerythrin, degradation rate, *Spirulina platensis*, *Porphyridium purpureum*

Funding. Russian Science Foundation supported this work (project “Development of scientific substantiation of industrial production of functional food products including extracts of *Porphyridium microalgae*” no. 24-26-20131).

For citation: Gudvilovich I.N., Borovkov A.B. Storage stability of phycobiliproteins in a hydroalcoholic solution evaluated by an optical method. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):362-370. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.927. EDN: TQPEED.

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли являются одним из важнейших источников натуральных красителей, интерес к которым в последнее время значительно возрос [1–4].

В состав светособирающих антенных комплексов, обычно присутствующих у цианобактерий (синезеленых водорослей), красных водорослей, некоторых криптозоомов, входят пигменты, относящиеся к группе фикобилипротеинов (ФБП), которые представляют собой ярко окрашенные и сильно флуоресцирующие белково-пигментные компоненты [1, 3, 5–7]. ФБП являются ценными природными продуктами биотехнологии с реальным и/или потенциальным применением в нутрицевтике и фармацевтике, пищевой и косметической промышленности, а также в биомедицинских исследованиях и клинической диагностике [1, 3, 4, 6]. Наиболее широкое практическое применение находят такие представители этой группы, как синий пигмент С-фикоцианин (С-ФЦ) и красный пигмент В-фикоэритрин (В-ФЭ) [2, 3, 5, 6, 8].

Потенциальное применение ФБП определяется чистотой получаемого продукта. Считается, что ФБП являются пригодными для пищевых целей, когда $D_{\max} \text{ ФБП} / D_{280} \leq 0,7$, химически чистыми – когда $D_{\max} \text{ ФБП} / D_{280}$ находится в диапазоне от 0,7 до 3,9, и аналитически чистыми – когда $D_{\max} \text{ ФБП} / D_{280} \geq 4,0$ (где D – оптическая плотность) [2, 5].

Благодаря своей белковой природе, водорастворимости и красивой окраске ФБП вызывают интерес прежде всего как натуральные пищевые красители [4, 5, 9]. Из-за определенной токсичности синтетических красящих веществ спрос на природные красители в производстве пищевых продуктов, детских игрушек, косметологии, фармацевтике только увеличивается [1, 3, 5]. Кроме того, благодаря высокому биологическому потенциалу ФБП, в том числе проявляемым антиоксидантным, противовоспалительным, гепатопротекторным и противоопухолевым свойствам, эти пигменты оказывают положительное влияние на здоровье человека [1–3, 6, 10].

ФБП высокой степени очистки благодаря их флуоресцентным свойствам широко применяют при проведении флуоресцентных анализов высокого разрешения в гистохимии, проточной цитофлуориметрии, клеточном флуоресцентном сортировке (сортировке разнородных клеток), флуоресцентной иммунодиагностике и в детектировании макромолекул [4]. Фикоэритрин в комплексе с флуоресцеином применяют для двойного мечения антител, что находит использование при диагностике онкологических заболеваний и синдрома приобретенного иммунодефицита [5].

Коммерческий интерес к этим соединениям обусловлен их высоким содержанием в биомассе водорослей и цианобактерий, а также достаточно простыми технологическими процедурами, позволяющими разрушить клеточные стенки и получить водные экстракты соединений, которые приобретают красивую синюю или розовую окраску [2, 4, 6, 11].

Тем не менее применение ФБП в пищевых продуктах ограничено их невысокой стабильностью. Процессы деструкции этих пигментов в водных растворах протекают под воздействием света и многих других физико-химических факторов, таких как низкие или высокие значения pH, высокая ионная сила раствора, высокие температуры [2, 4, 9, 12–14]. Кроме того, водные растворы белковых соединений являются хорошей средой для размножения микрофлоры. При высушивании получаемой биомассы также наблюдается частичная денатурация ФБП, несмотря на это, характерный цвет и биологическая активность высушенных препаратов при условии соблюдения режимов хранения сохраняются годами [15].

Дегградация белковой фракции оказывает значительное влияние на сохранность цвета ФБП [10, 11]. Для защиты структурного порядка белковых цепей в качестве консервантов часто используются стабилизирующие агенты (глюкоза, сахароза, лимонная кислота, сорбиновая кислота, хлорид натрия, аскорбиновая кислота и азид натрия [2, 5, 9, 10, 13], которые позволяют сохранить цвет пигмента и избежать его денатурации.

В то же время применение ряда добавок для стабилизации ФБП, таких как азид натрия и дитиотриэтол, неприемлемо в случае их применения в медицине и пищевой промышленности.

Стабильность ФБП крайне важна для расширения их использования в различных прикладных направлениях. Поскольку пищевые красители могут подвергаться воздействию неблагоприятных условий как на этапах производства, так и при хранении, важно оценить их стабильность под воздействием светового и температурного факторов, а также при добавлении консерванта, пригодного для пищевого использования, для разработки технологических режимов хранения продуктов [9, 11, 14]. В связи с этим проблема подбора условий для сохранения их структуры остается достаточно актуальной.

Использование достаточно широкого спектра консервантов повышает стабильность ФБП и является эффективным способом увеличить сроки их хранения. Ранее было показано, что в качестве консерванта при хранении фикоцианина и фикоэритрина в водных растворах может быть использован этанол с концентрацией до 20% [12, 16, 17]. Целью этой работы была оценка стабильности ФБП, выделенных из биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis* и красной микроводоросли *Porphyridium purpureum*, при их хранении в водно-спиртовом растворе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Водный экстракт С-ФЦ получали из биомассы цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordstedt) Gomont, а В-ФЭ – из красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* (семейство Bangiales, класс Rhodophyta). Культуры *A. platensis* и *P. purpureum* из коллекции Научно-образовательного центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» «Коллекция гидробионтов Мирового океана» выращивали в лабораторных условиях на питательных средах состава:

NaNO_3 – 1,2 г $\times$ л $^{-1}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,45 г $\times$ л $^{-1}$, Na_2EDTA – 0,037 г $\times$ л $^{-1}$, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,0265 г $\times$ л $^{-1}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,004 г $\times$ л $^{-1}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0031 г $\times$ л $^{-1}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,0009 г $\times$ л $^{-1}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,0017 г $\times$ л $^{-1}$ – для *P. purpureum* [18];

NaHCO_3 – 16,8 г $\times$ л $^{-1}$, K_2HPO_4 – 0,5 г $\times$ л $^{-1}$, NaNO_3 – 2,5 г $\times$ л $^{-1}$, K_2SO_4 – 1,0 г $\times$ л $^{-1}$, NaCl – 1,0 г $\times$ л $^{-1}$, Na_2EDTA – 0,08 г $\times$ л $^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г $\times$ л $^{-1}$, CaCl_2 – 0,04 г $\times$ л $^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г $\times$ л $^{-1}$ – для *A. platensis* [8].

Биомассу заливали небольшим количеством воды, двукратно замораживали и размораживали с целью разрушения клеточных оболочек для быстрого извлечения ФБП. Далее проводили экстракцию фосфатным буфером (0,05 М, pH = 7) на холоде (5 °С) в течение 24 часов. Полученный экстракт центрифугировали при 3000 об. $\times$ мин $^{-1}$ в течение 15 минут. Образцы экстрактов доводили 96%-м этанолом до конечной концентрации этанола в растворе 20%. Хранение экстрактов осуществляли в следующих условиях: в темноте при температуре 5 °С; в темноте при температуре 18–20 °С; при естественной освещенности и температуре 18–20 °С. Хранение водно-спиртовых экстрактов ФБП в этих условиях проводили на протяжении 3 месяцев, кон-

троль концентраций пигментов осуществляли оптическим методом. Спектры экстрактов ФБП промеряли на регистрирующем спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия) в диапазоне длин волн 400–800 нм с шагом 0,1 нм. Регистрировали оптическую плотность полученных экстрактов в области характеристических максимумов поглощения В-ФЭ (545 нм), R-фикоцианина (R-ФЦ) (615 нм), С-ФЦ (620 нм) и аллофикоцианина (АФЦ) (650 нм), а также при 750 нм (для учета неспецифического поглощения раствора). Концентрацию пигментов в водных экстрактах рассчитывали по [19].

Для *P. purpureum*:

$$\text{В-ФЭ} = 0,1 \times D_{545} - 0,063 \times D_{615} + 0,023 \times D_{650};$$

$$\text{R-ФЦ} = 0,154 \times D_{615} - 0,080 \times D_{650};$$

$$\text{АФЦ} = 0,147 \times D_{650} - 0,020 \times D_{615}.$$

Для *A. platensis*:

$$\text{С-ФЦ} = 0,166 \times D_{620} - 0,091 \times D_{650};$$

$$\text{АФЦ} = 0,159 \times D_{650} - 0,041 \times D_{620},$$

где D – значения оптической плотности для соответствующих длин волн.

Скорость деструкции пигментов в растворах k , сут. $^{-1}$, рассчитывали аппроксимацией полученных эмпирических данных по концентрации соответствующих пигментов, используя уравнение

$$C = C_0 \times \exp(-k \times t), \quad (1)$$

где C – концентрация пигмента; C_0 – концентрация пигмента в начальный момент времени; t – время, сут.

Рассчитывали средние арифметические $\bar{x}$, стандартные отклонения S , основные ошибки средних, доверительные интервалы для средних $\Delta\bar{x}$. Все расчеты проводили в программах Libre Office и Scidavis для уровня значимости $\alpha = 0,05$. В таблице и на графиках представлены средние значения и рассчитанные доверительные интервалы ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$) для трех повторностей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Синий пигмент фикоцианин и красный фикоэритрин находят наибольшее практическое применение; другие ФБП, содержащиеся в биомассе клеток микроводорослей и цианобактерий, производятся в ультрамалых количествах в основном для исследовательских целей [5]. Как показано ранее, эти пигменты весьма чувствительны к условиям окружающей среды, а деградация белковой фракции существенно влияет на стабильность окраски и биоактивность фикоцианина и фикоэритрина [13, 20], то есть на параметры, являющиеся основными для практического применения этих пигментов.

Отсутствие консервантов при хранении ФБП значительно сокращает сроки их хранения, особенно в случае воздействия светового и температурного факторов [16, 21]. Высокую скорость деструкции пигментов в этом случае, вероятно, можно объяснить разрушением пигмента под действием негативных факторов, а также сопутствующим размножением микрофлоры в экстракте [16].

В связи с этим часто рассматривают применение стабилизаторов для сохранения цвета и предотвращения процессов окисления [9, 10, 13]. Некоторые вещества исключаются из соображений безопасности, например азид натрия и дитиотреитол [13], кроме того, консерванты и стабилизаторы не должны денатурировать белок или изменять его оптические и антиок-

сидантные свойства. Так, использование 5% хлорида натрия индуцировало белковое осаждение [13], а его эффективность как стабилизатора фикоцианина была отмечена при более низком содержании соли в растворе ($2,5\text{--}20\text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$), причем с увеличением концентрации NaCl сохранность пигмента при хранении повышалась [10]. Использование лимонной кислоты в качестве консерванта позволило сохранить 67% фикоцианина от его первоначального количества, в то время как без использования консервантов после 45 дней хранения в растворе оставалось менее 3% пигмента [13].

На рис. 1 показан характер изменения концентраций ФБП в водно-спиртовом растворе при их хранении в различных условиях.

За 3 месяца хранения водно-спиртовых растворов пигментов концентрации С-ФЦ и В-ФЭ снизились при всех вариантах хранения экстрактов. Так, концентрация С-ФЦ существенно снизилась даже при хранении его в темноте и на холоде: снижение составило 14 и 44% за 27 и 90 суток соответственно от его первоначального содержания в растворе (см. рис. 1, а). При аналогичных условиях хранения концентрация В-ФЭ на протяжении 27 суток существенно не изменилась, а существенное снижение концентрации пигмента отмечено после этого периода (см. рис. 1, б). Таким образом, общее снижение концентрации В-ФЭ за 3 месяца составило 17% по сравнению с первоначальными значениями.

Следует отметить, что экстракты В-ФЭ при хранении в темноте сохраняли интенсивную розовую окраску в течение 3 месяцев.

При хранении экстрактов при комнатной температуре в темноте концентрация С-ФЦ снижалась значительно быстрее, чем в первом варианте. Так, за 27 суток содержание этого пигмента в растворе уменьшилось в 2,5 раза, а за 90 суток – в 6 раз. Снижение концентрации В-ФЭ при аналогичных условиях хранения также было более четко выражено: за 27 суток содержание пигмента в растворе уменьшилось на 11%, а за 90 суток – на 29% по сравнению с первоначальными значениями (см. рис. 1, а, б).

Самая высокая скорость деструкции С-ФЦ и В-ФЭ в водно-спиртовых растворах наблюдалась при хранении их на свету при комнатной температуре: в этих условиях концентрация С-ФЦ уже через 5 суток была близка к нулевым значениям, а концентрация В-ФЭ снизилась до минимальных значений за 27 суток (см. рис. 1, а, б).

Характер изменения динамики концентрации R-ФЦ в основном совпадал с изменением концентрации В-ФЭ при аналогичных условиях хранения (см. рис. 1, с). Что касается изменения концентрации АФЦ в водно-спиртовом растворе, то этот пигмент был наиболее стабилен: даже при хранении на свету при комнатной температуре его концентрация за 27 суток снизилась на 13% от пер-

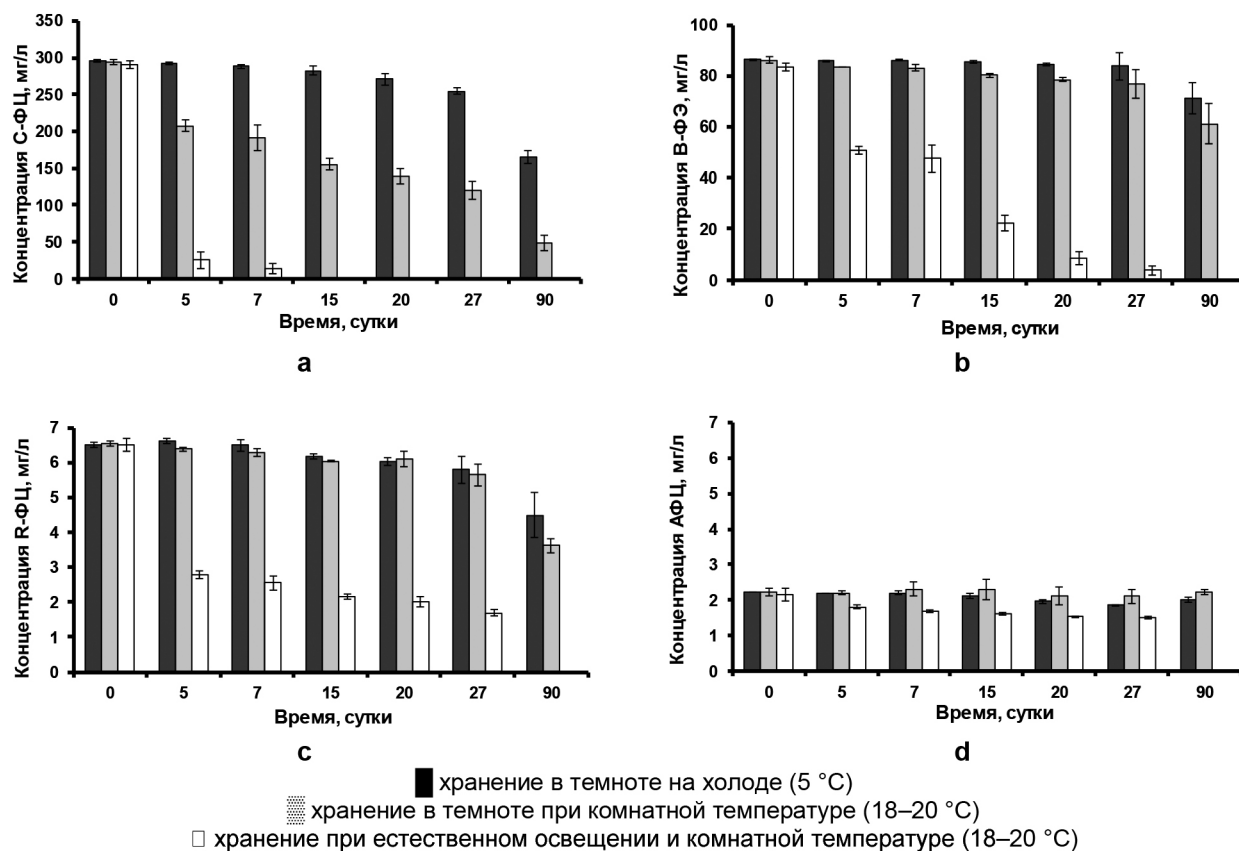


Рис. 1. Динамика концентраций фикобилипротеинов в водно-спиртовых растворах: а – С-фикоцианина; б – В-фикоэритрина; с – R-фикоцианина; d – аллофикоцианина

Fig. 1. Dynamics of phycobiliprotein concentrations in water-alcohol solution: a – C-phycocyanin; b – B-phycoerythrin; c – R-phycocyanin; d – allophycocyanin

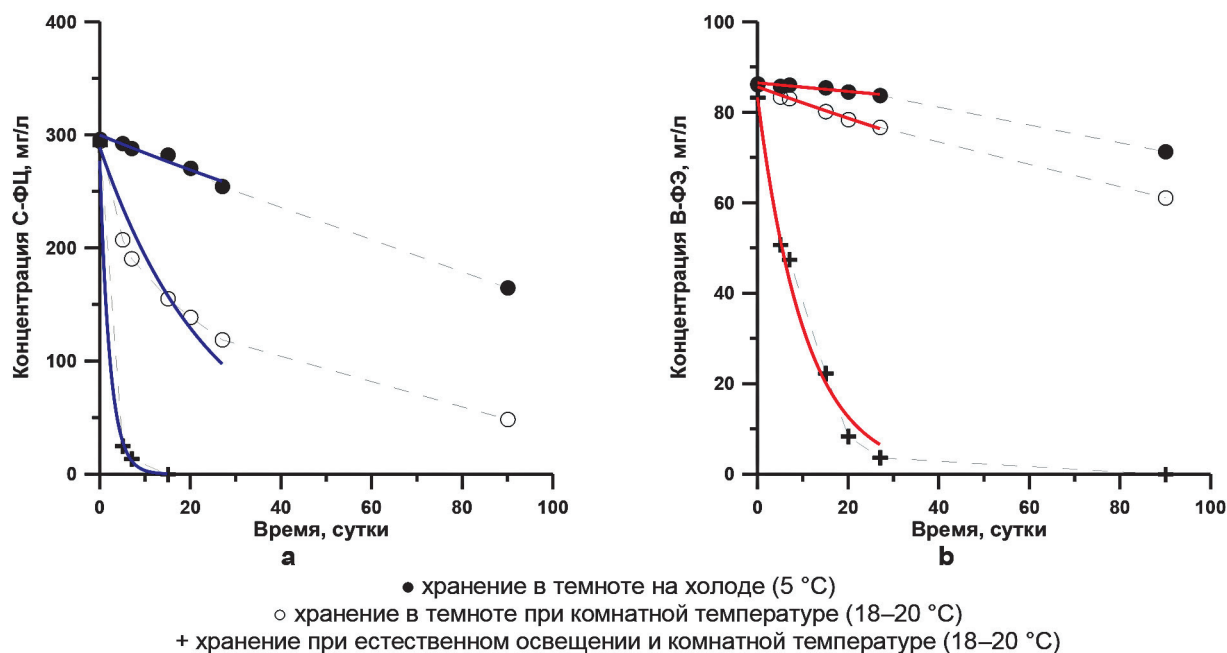


Рис. 2. Изменение концентраций С-фикоцианина (а) и В-фикоэритрина (b) в водно-спиртовых растворах (сплошные линии – аппроксимация экспериментальных данных уравнением (1); значения коэффициентов (скорости деградации пигментов) приведены в таблице)

Fig. 2. Degradation of C-phycoerythrin (a) and B-phycoerythrin (b) in water-alcohol solution (solid lines are approximation of experimental data by equation (1); the values of coefficients (pigments degradation rates) are given in Table)

Скорость деградации фикобилипротеинов в водно-спиртовых растворах при различных условиях хранения

Degradation rate of phycobiliproteins in water-alcohol solutions under different storage conditions

Условия хранения	С-фикоцианин		В-фикоэритрин	
	Скорость деградации, сут. ⁻¹	R ²	Скорость деградации, сут. ⁻¹	R ²
В темноте при температуре 5 °C	0,0054	0,94	0,0011	0,93
В темноте при температуре 18–20 °C	0,0400	0,89	0,0042	0,99
При естественном освещении и температуре 18–20 °C	0,4466	0,99	0,094	0,99

воначальной, а при хранении в темноте существенно не изменилась за 90 суток хранения (см. рис. 1, d).

На основании полученных экспериментальных данных были рассчитаны скорости деградации В-ФЭ и С-ФЦ в водно-спиртовых растворах (рис. 2, таблицу).

Таким образом, наименее стойким при хранении в водно-спиртовом растворе оказался пигмент С-ФЦ: скорость его деградации даже при наиболее благоприятных условиях хранения (темнота, холод) была в 5 раз выше, чем скорость деградации В-ФЭ при аналогичных условиях (см. рис. 2, а, таблицу).

Повышение температуры от 5 до 18–20 °C существенно повлияло на процессы деградации С-ФЦ, увеличив ее скорость более чем в 7 раз (см. рис. 2, а, таблицу). В случае В-ФЭ аналогичное изменение условий также оказало влияние на процессы деструкции пигмента: скорость его деградации увеличилась в 4 раза (см. рис. 2, b, таблицу). Наиболее неблагоприятными условиями, при которых отмечена наиболее высокая скорость деградации пигментов в растворах, является комбинация освещенности и повышенной температуры. В таких условиях скорости деградации В-ФЭ и С-ФЦ в проведенном эксперименте были максимальными и в

9 и 80 раз соответственно превышали аналогичные показатели при хранении этих пигментов в темноте и на холоде (см. рис. 2, таблицу).

В процессе хранения также изменялись значения соотношений ФБП (рис. 3).

Значения соотношения В-ФЭ/Р-ФЦ на протяжении эксперимента снижались только для варианта хранения на свету при комнатной температуре (см. рис. 3, а). При хранении водно-спиртовых растворов ФБП в темноте численное значение этого соотношения увеличивалось на 10 и 20% за 1 и 3 месяца соответственно. Изменение динамики значений соотношений В-ФЭ/АФЦ и Р-ФЦ/АФЦ имело однонаправленный характер для каждого из вариантов эксперимента: снижалось за 3 месяца хранения на 31–36% и 46–49% для первого и второго вариантов соответственно и за 1 месяц более чем на 75% для третьего варианта (см. рис. 3, b, c). Это свидетельствует о преимущественной деградации В-ФЭ и Р-ФЦ по сравнению с АФЦ.

В современных исследованиях уделяется большое внимание кинетике деградации ФБП в растворах, а также способам снижения скорости протекания этих процессов. Так, установлено, что концентрация пигментов,

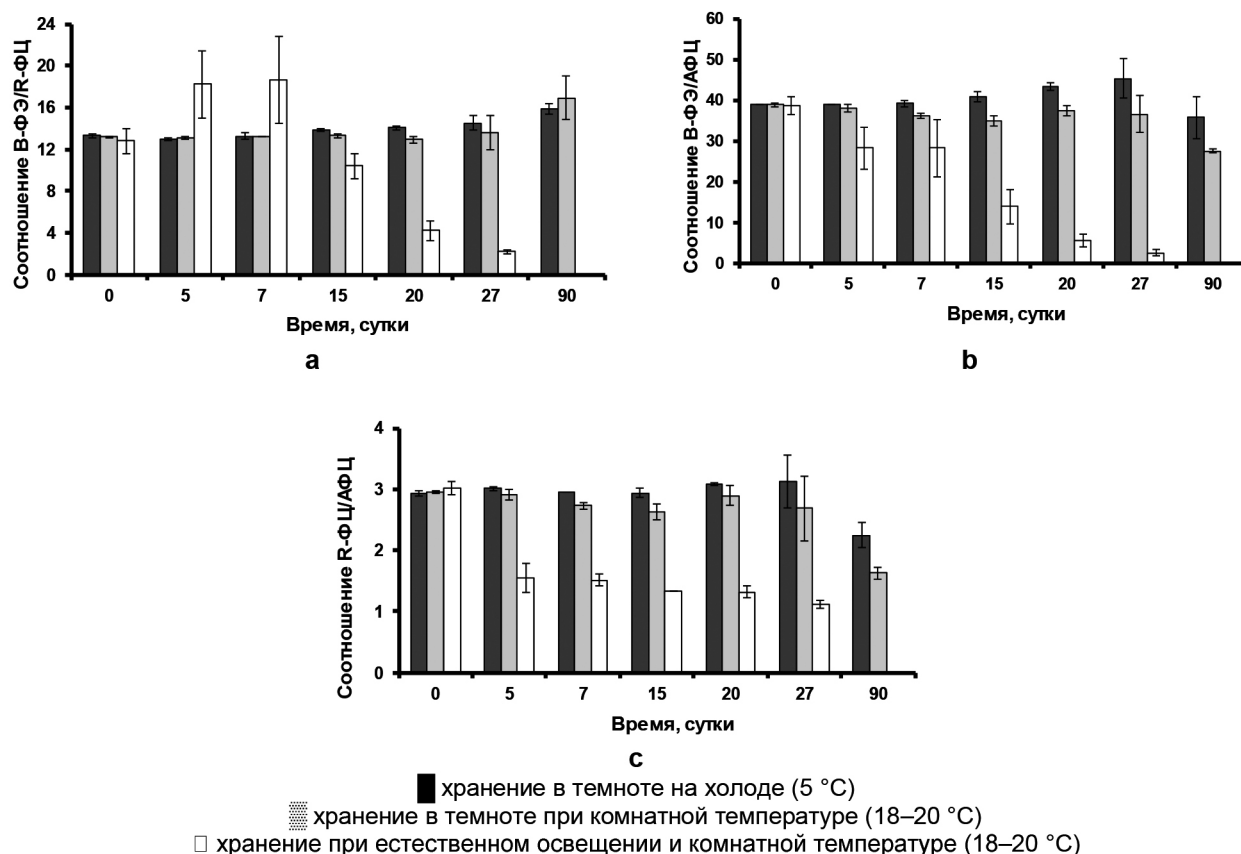


Рис. 3. Динамика соотношений фикобилипротеинов в водно-спиртовом растворе: а – В-фикоэритрин/Р-фикоцианин; б – В-фикоэритрин/аллофикоцианин, в – Р-фикоцианин/аллофикоцианин

Fig. 3. Dynamics of phycobiliprotein ratios in water-alcohol solution: а – B-phycoerythrin/R-phycocyanin; б – B-phycoerythrin/allophycocyanin, в – R-phycocyanin/allophycocyanin

контролируемая по значениям спектров поглощения, снижалась в зависимости от времени, температуры и интенсивности светового воздействия [7, 11, 13]. При более низкой температуре процесс деградации ФБП в растворе протекал значительно медленнее, чем при повышенной [10, 11, 13, 14]. Показано, что при воздействии света концентрация фикоцианина в растворе снижалась дозозависимым образом как функция времени, а совместное воздействие повышенной температуры и света приводило как к снижению относительной концентрации фикоцианина, так и к уменьшению периода его полураспада [10, 13].

Согласно предыдущим исследованиям, оптимальными условиями, необходимыми для поддержания стабильности ФБП в водных растворах, являются: pH от 5,5 до 7,5, низкая температура и хранение в темноте [10, 11, 13]. Так, было отмечено, что наиболее яркая окраска водных растворов фикоэритрина и фикоцианина наблюдалась в диапазоне pH от 6,5 до 7,5, а увеличение кислотности или щелочности среды вызывало резкое снижение максимума поглощения пигментов, что приводило к изменениям в характере кривой поглощения [7, 11, 20]. При существенном отклонении значений pH от оптимального диапазона наблюдалась коагуляция и осаждение ФБП в растворе, что приводило к обесцвечиванию пигмента и в целом к снижению качества экстрактов [7, 11, 12, 14, 20].

Кроме того, отмечено, что растворы фикоцианина, имеющие пищевую чистоту, демонстрировали более высокую стабильность по сравнению с растворами очищенного пигмента. По-видимому, многоступенчатый процесс очистки и стабилизации белка, включая лиофилизацию, оказывает влияние на нативную структуру белка, чувствительную к такому воздействию [13].

Несмотря на то что полученные в эксперименте растворы пигментов не проходили стадии дополнительной очистки, а pH экстрактов находился в оптимальном для хранения диапазоне, экспериментальные данные подтвердили неустойчивость С-ФЦ в водно-спиртовом растворе: даже при хранении в темноте через 27 суток в растворе оставалось менее 50% от его первоначального содержания. Световой фактор являлся наиболее неблагоприятным и определяющим сроки хранения исследованных пигментов в растворе, особенно в комбинации с повышением температуры хранения. Самые высокие темпы деградации С-ФЦ, Р-ФЦ и В-ФЭ отмечены при их хранении на свету при комнатной температуре. В этих условиях практически полная деградация С-ФЦ в растворе отмечена после 1 недели, а Р-ФЦ и В-ФЭ – после 4 недель хранения. В целом при хранении в водно-спиртовом растворе отмечена высокая стабильность АФЦ: даже при воздействии света на протяжении 90 суток хранения при комнатной температуре его концентрация в растворе существенно не изменялась.

Полученные экспериментальные данные в целом соответствуют общей тенденции по исследованиям, представленным в литературе: основными физико-химическими параметрами, определяющими стабильность ФБП в растворах, являются световые и температурные условия, а также pH [2, 4, 9, 12–14]. Рассчитанные скорости деградации С-ФЦ и В-ФЭ в проведенном эксперименте (см. таблицу) соответствуют данным, представленным в работах [7, 11, 14] и полученным при аналогичных условиях хранения ФБП. При хранении С-ФЦ в темноте на холоде в течение 15 суток стабильность пигмента в водном растворе без консерванта и в водно-спиртовом растворе была сопоставима, что подтверждается полученными экспериментальными данными [16, 21]. При повышении температуры до комнатной скорость деструкции С-ФЦ в случае хранения его в водно-спиртовом растворе в 3 раза ниже, чем в растворе без консервантов [16, 21].

Все вышеизложенное подтверждает возможность использования этилового спирта в качестве консерванта водных экстрактов ФБП, при этом скорость деструкции пигментов будет определяться условиями их хранения. Обязательным условием сохранения наиболее используемых пигментов С-ФЦ и В-ФЭ в водно-спиртовых растворах является отсутствие света, а в случае С-ФЦ и пониженная температура, что согласуется с данными, представленными в литературе [2, 10, 13]. Допустимым также является хранение В-ФЭ в темноте при комнатной температуре. Такой режим может обеспечить сохранность до 86% пигментов в водно-спиртовом растворе: С-ФЦ на срок до 30 суток, а В-ФЭ – до 90 суток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе осуществленной работы определен характер изменения концентрации С-ФЦ, В-ФЭ, R-ФЦ и АФЦ в водно-спиртовом растворе в зависимости от световых и температурных условий. Концентрации всех пигментов, за исключением АФЦ, снижались при хранении на свету при комнатной температуре. В проведенном исследовании световой фактор оказывал более негативное влияние на стабильность пигментов по сравнению с температурным, именно он определял скорость деструкции пигментов и сроки хранения ФБП в водно-спиртовых растворах. В целом наибольшую стабильность при хранении продемонстрировал АФЦ, а пигмент С-ФЦ в водно-спиртовом растворе оказался наименее стойким по сравнению с другими исследованными ФБП.

Хранение водно-спиртовых экстрактов пигментов в темноте на холоде является предпочтительным; допустимо хранение В-ФЭ в темноте при комнатной температуре. Такие условия хранения обеспечивают сохранность не менее 85% пигментов С-ФЦ и В-ФЭ в водно-спиртовых растворах на протяжении 25–30 суток. Полученные результаты демонстрируют относительную стабильность ФБП, что позволяет вводить их в рецептуру косметических препаратов, продуктов питания и напитков в качестве альтернативы химическим пигментам. Кроме того, существует еще ряд консервантов, признанных безопасными для человека, что является базой для продолжения исследований в этом направлении ввиду широких перспектив применения этой группы пигментов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Jing K. Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent // *Biochemical Engineering Journal*. 2016. Vol. 109. P. 282–296. DOI: 10.1016/J.BEJ.2016.01.025.
2. Hsieh-Lo M., Castillo G., Ochoa-Becerra M.A., Mojica L. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability // *Algal Research*. 2019. Vol. 42. P. 101600. DOI: 10.1016/J.ALGAL.2019.101600.
3. Dagnino-Leone J., Figueroa C.P., Castañeda M.L., Youlton A.D., Vallejos-Almirall A., Agurto-Muñoz A., et al. Phycobiliproteins: structural aspects, functional characteristics, and biotechnological perspectives // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2022. Vol. 20. P. 1506–1527. DOI: 10.1016/j.csbj.2022.02.016.
4. Kovaleski G., Kholany M., Dias L.M.S., Correia S.F.H., Ferreira R.A.S., Coutinho J.A.P., Ventura S.P.M. Extraction and purification of phycobiliproteins from algae and their applications // *Frontiers in Chemistry*. 2022. Vol. 10. P. 1065355. DOI: 10.3389/fchem.2022.1065355.
5. Stadnichuk I.N., Tropin I.V. Phycobiliproteins: structure, functions and biotechnological applications // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017. Vol. 53. P. 1–10. DOI: 10.1134/S0003683817010185.
6. Pagels F., Guedes A.C., Amaro H.M., Kijjoa A., Vasconcelos V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: chemistry and biotechnological applications // *Biotechnology Advances*. 2019. Vol. 37, no. 3. P. 422–443. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.010.
7. Nath P.C., Bandyopadhyay T.K., Mahata N., Tiwari O.N., Bobby M.N., Indira M., et al. C-phycoerythrin production from *Anabaena* sp. BTA 903: optimization, production kinetics, thermodynamic and stability analysis // *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2024. Vol. 14. P. 19739–19751. DOI: 10.1007/s13399-023-04109-9.
8. *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology / ed. A. Vonshak. London: Taylor & Francis, 1997. 235 p.
9. Nowruzi B., Konur O., Anvar S.A.A. The stability of the phycobiliproteins in the adverse environmental conditions relevant to the food storage // *Food and Bioprocess Technology*. 2022. Vol. 15. P. 2646–2663. DOI: 10.1007/s11947-022-02855-8.
10. Wu H.-L., Wang G.-H., Xiang W.-Z., Li T., He H. Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from *Spirulina platensis* // *International Journal of Food Properties*. 2016. Vol. 19, no. 10. P. 2349–2362. DOI: 10.1080/10942912.2015.1038564.
11. Pereira T., Barroso S., Mendes S., Gil M.M. Stability, kinetics and application study of phycobiliprotein pigments extracted from red algae *Gracilaria gracilis* // *Journal of Food Science*. 2020. Vol. 85, no. 10. P. 3400–3405. DOI: 10.1111/1750-3841.15422.
12. Marraskuranto E., Raharjo T.J., Kasiamdari R.S., Nuringtyas T.R. Color stability of phycoerythrin crude extract (PECE) from *Rhodomonas salina* toward physicochemical factors // *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 2019. Vol. 14, no. 1. P. 21–31. DOI: 10.15578/squalen.v14i1.379.

13. Adjali A., Clarot I., Chen Z., Marchioni E., Boudier A. Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: a short review // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2022. Vol. 12, no. 3. P. 406–414. DOI: 10.1016/j.jpha.2021.12.005.

14. Shkolnikov Lozober H., Okun Z., Parvari G., Shpigelman A. The effect of storage and pasteurization (thermal and high-pressure) conditions on the stability of phycocyanobilin and phycobiliproteins // *Antioxidants*. 2023. Vol. 12, no. 3. P. 568. DOI: 10.3390/antiox12030568.

15. De Morais M.G., da Silva Vaz B., de Morais E.G., Vieira Costa J.A. Biological effects of spirulina (*Arthrospira*) biopolymers and biomass in the development of nanostructured scaffolds // *BioMed Research International*. 2014. Vol. 2014, no. 1. P. 1–9. DOI: 10.1155/2014/762705.

16. Береговая Н.М. Особенности хранения водного экстракта R-фикоэритрина // *Экология моря*. 2010. Т. 81. С. 13–16. EDN: ULDZYV.

17. Береговая Н.М., Гудвиллович И.Н. Хранение водно-спиртового экстракта С-фикоцианина, полученного из микроводоросли *Spirulina platensis* // *Экология моря*. 2010. Т. 81. С. 17–22. EDN: ULDZZF.

18. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей // *Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук*. 1981. Т. 5. N 1. С. 75–82.

19. Стадничук И.Н. Фикобилипротеины. М.: Мир, 1990. 196 с.

20. Лось С.И. Биохимические основы получения фикоэритрина из морских водорослей // *Альгология*. 2008. Т. 18. N 4. С. 375–385. EDN: JVOIFR.

21. Mishra S.K., Shrivastav A., Mishra S. Effect of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis* // *Process Biochemistry*. 2008. Vol. 43, no. 4. P. 339–345. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.12.012.

REFERENCES

1. Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Jing K. Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal*. 2016;109:282-296. DOI: 10.1016/J.BEJ.2016.01.025.

2. Hsieh-Lo M., Castillo G., Ochoa-Becerra M.A., Mojica L. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. *Algal Research*. 2019;42:101600. DOI: 10.1016/J.ALGAL.2019.101600.

3. Dagnino-Leone J., Figueroa C.P., Castañeda M.L., Youlton A.D., Vallejos-Almirall A., Agurto-Muñoz A., et al. Phycobiliproteins: structural aspects, functional characteristics, and biotechnological perspectives. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2022;20:1506-1527. DOI: 10.1016/j.csbj.2022.02.016.

4. Kovalski G., Kholany M., Dias L.M.S., Correia S.F.H., Ferreira R.A.S., Coutinho J.A.P., Ventura S.P.M. Extraction and purification of phycobiliproteins from algae and their applications. *Frontiers in Chemistry*. 2022;10:1065355. DOI: 10.3389/fchem.2022.1065355.

5. Stadnichuk I.N., Tropin I.V. Phycobiliproteins: structure, functions and biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017;53:1-10. DOI: 10.1134/S0003683817010185.

6. Pagels F., Guedes A.C., Amaro H.M., Kijjoa A., Vasconcelos V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 2019;37(3):422-443. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.010.

7. Nath P.C., Bandyopadhyay T.K., Mahata N., Tiwari O.N., Bobby M.N., Indira M., et al. C-phycoerythrin production from *Anabaena* sp. BTA 903: optimization, production kinetics, thermodynamic and stability analysis. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2024;14:19739-19751. DOI: 10.1007/s13399-023-04109-9.

8. Vonshak A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis; 1997, 235 p.

9. Nowruzi B., Konur O., Anvar S.A.A. The stability of the phycobiliproteins in the adverse environmental conditions relevant to the food storage. *Food and Bioprocess Technology*. 2022;15:2646-2663. DOI: 10.1007/s11947-022-02855-8.

10. Wu H.-L., Wang G.-H., Xiang W.-Z., Li T., He H. Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Properties*. 2016;19(10):2349-2362. DOI: 10.1080/10942912.2015.1038564.

11. Pereira T., Barroso S., Mendes S., Gil M.M. Stability, kinetics and application study of phycobiliprotein pigments extracted from red algae *Gracilaria gracilis*. *Journal of Food Science*. 2020;85(10):3400-3405. DOI: 10.1111/1750-3841.15422.

12. Marraskuranto E., Raharjo T.J., Kasiamdari R.S. Nuringtyas T.R. Color stability of phycoerythrin crude extract (PECE) from *Rhodomonas salina* toward physicochemical factors. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 2019;14(1):21-31. DOI: 10.15578/squalen.v14i1.379.

13. Adjali A., Clarot I., Chen Z., Marchioni E., Boudier A. Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: a short review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2022;12(3):406-414. DOI: 10.1016/j.jpha.2021.12.005.

14. Shkolnikov Lozober H., Okun Z., Parvari G., Shpigelman A. The effect of storage and pasteurization (thermal and high-pressure) conditions on the stability of phycocyanobilin and phycobiliproteins. *Antioxidants*. 2023;12(3):568. DOI: 10.3390/antiox12030568.

15. De Morais M.G., da Silva Vaz B., de Morais E.G., Vieira Costa J.A. Biological effects of spirulina (*Arthrospira*) biopolymers and biomass in the development of nanostructured scaffolds. *BioMed Research International*. 2014;2014(1):1-9. DOI: 10.1155/2014/762705.

16. Beregovaya N.M. Particularity of water R-phycoerythrin extract keeping. *Ekologiya morya*. 2010;81:13-16. (In Russian). EDN: ULDZYV.

17. Beregovaya N.M., Gudvilovich I.N. C-phycoecianin water extract keeping from microalgae *Spirulina platensis*. *Ekologiya morya*. 2010;81:17-22. (In Russian). EDN: ULDZZF.

18. Trenkenshu R.P., Terskov I.A., Sid'ko F.Ya. Dense cultures of marine microalgae. *Izvestiya Sibirskogo otdeleniya Akademii nauk SSSR. Seriya biologicheskikh nauk*. 1981;5(1):75-82. (In Russian).

19. Stadnichuk I.N. Phycobiliproteins. Moscow: Mir; 1990, 196 p. (In Russian).

20. Los' S.I. Biochemical principles for phycoerythrin production from marine algae. *Algologia*. 2008;18(4):375-385. (In Russian). EDN: JVOIFR.

21. Mishra S.K., Shrivastav A., Mishra S. Effect of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*. 2008;43(4):339-345. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.12.012.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Гудвилевич Ирина Николаевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Институт биологии южных морей
имени А.О. Ковалевского РАН,
299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2,
Российская Федерация,
✉ gudirina2008@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7412-8283>

Боровков Андрей Борисович,
к.б.н., ведущий научный сотрудник,
Институт биологии южных морей
имени А.О. Ковалевского РАН,
299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2,
Российская Федерация,
spirit2000sev@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6612-491X>

Вклад авторов

И.Н. Гудвилевич – проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов, осуществление расчетов, написание текста статьи.
А.Б. Боровков – разработка концепции Исследования, обсуждение результатов, осуществление расчетов, подготовка иллюстративного материала.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 21.05.2024.
Одобрена после рецензирования 14.06.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina N. Gudvilovich,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
A.O. Kovalevsky Institute of Biology
of the Southern Seas, RAS,
2, Nakhimov Ave., Sevastopol, 299011,
Russian Federation,
✉ gudirina2008@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7412-8283>

Andrei B. Borovkov,
Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher,
A.O. Kovalevsky Institute of Biology
of the Southern Seas, RAS,
2, Nakhimov Ave., Sevastopol, 299011,
Russian Federation,
spirit2000sev@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6612-491X>

Contribution of the authors

Irina N. Gudvilovich – conducting experiments, processing the data obtained, discussion results, calculations, writing the text of manuscript.
Andrei B. Borovkov – research concept development, results discussion, calculations, preparation of illustrative material.

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 21.05.2024.
Approved after reviewing 14.06.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.



Технологические аспекты переработки бересты в компонент пищевых систем для населения Арктики и Крайнего Севера

М.Н. Школьников***, И.Н. Павлов***, Е.В. Аверьянова*✉,
Е.Д. Рожнов***, О.В. Чугунова**

*Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова,
Барнаул, Российская Федерация

**Уральский государственный экономический университет,
Екатеринбург, Российская Федерация

***Бийский технологический институт (филиал) Алтайского государственного технического
университета им. И.И. Ползунова, Бийск, Российская Федерация

Аннотация. Бетулинсодержащие микронутриенты улучшают качество, увеличивают физиологическую активность и срок хранения пищевых систем, что позволяет разрабатывать физиологически функциональные продукты питания для населения, проживающего в регионах Арктики и Крайнего Севера. Целью данного исследования являлась оптимизация процесса извлечения бетулина из *Betula pendula* Roth. для использования в пищевых системах нутрициологической поддержки населения, проживающего в регионах с экстремальными климатическими условиями, методом математического моделирования. Береста заготовлена в летние месяцы 2015–2021 гг. в предгорной зоне Алтайского края. Математическая оптимизация процесса экстракции бетулина из бересты белоствольных берез (*Betula pendula* Roth.), содержащей более 20% масс. основного вещества, в условиях автоклавирования осуществлена с использованием программного пакета Statistica 10. На основании анализа поверхностей отклика, построенных по уравнению регрессии, определены оптимальные параметры экстракции бетулина этиловым спиртом: размер частиц бересты 3×3 мм; гидромодуль 1:5; продолжительность процесса 150 мин, при которых выход бетулина составил более 97%, его подлинность и безопасность подтверждены экспериментально. Физиологическая активность бетулина и примеры его использования в составе различных пищевых систем для пролонгирования срока хранения доказывают возможность его использования в качестве природного консерванта и функционального компонента – антиоксиданта для обогащения продуктов питания, в частности предназначенных для населения, проживающего в экстремальных климатических условиях Арктики и Крайнего Севера.

Ключевые слова: бетулин, экстракция, береста, оптимизация условий, пищевая добавка, климатические условия Арктики и Крайнего Севера

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки Российской Федерации (государственное задание № 075-00042-24-00, номер темы FZMM-2024-0003).

Для цитирования: Школьников М.Н., Павлов И.Н., Аверьянова Е.В., Рожнов Е.Д., Чугунова О.В. Технологические аспекты переработки бересты в компонент пищевых систем для населения Арктики и Крайнего Севера // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 371–382. DOI: 10.21285/achb.929. EDN: OWECVD.

Technological aspects of birch bark processing into a component of food systems for the population of the Arctic and the Far North

Marina N. Shkolnikova^{***}, Igor N. Pavlov^{***}, Elena V. Averyanova^{*✉},
Evgeny D. Rozhnov^{***}, Olga V. Chugunova^{**}

^{*}Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russian Federation

^{**}Ural State University of Economics, Yekaterinburg, Russian Federation

^{***}Biysk Technological Institute (Branch) of the Altai State Technical University, Biysk, Russian Federation

Abstract. Betulin-containing micronutrients increase the quality, physiological activity, and shelf life of food systems. Such micronutrients are relevant for developing physiologically functional food products for the population residing in the regions of the Arctic and the Far North. In this research, we aim to optimize the process of extracting betulin from *Betula pendula* Roth. for use in food systems for nutritional support of the population residing in regions with extreme climatic conditions by the method of mathematical modeling. Birch bark was harvested in the summer months of 2015–2021 in the foothill zone of the Altai Krai. Mathematical optimization of the process of betulin extraction from birch bark of white-trunked birches (*Betula pendula* Roth.), containing more than 20 wt% of the main substance, under autoclaving conditions was carried out using the Statistica 10 software package. Based on an analysis of response surfaces constructed using a regression equation, optimal parameters for betulin extraction with ethyl alcohol were determined. Thus, the birch bark particle size equals 3×3 mm; hydromodulus is 1:5; process duration is 150 min. Under these parameters, the betulin yield achieved more than 97%, with its authenticity and safety being confirmed experimentally. The physiological activity of betulin, as well as its usage examples in various food systems to prolong shelf life, prove its feasibility as a natural preserving agent. In addition, betulin can be used as a functional component, i.e., as an antioxidant for enriching food products, in particular, those intended for the population residing in extreme climatic conditions of the Arctic and the Far North.

Keywords: betulin, extraction, birch bark, optimization of conditions, food additive, climatic conditions of the Arctic and the Far North

Funding. Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation supported this work (project 075-00042-24-00, FZMM-2024-0003).

For citation: Shkolnikova M.N., Pavlov I.N., Averyanova E.V., Rozhnov E.D., Chugunova O.V. Technological aspects of birch bark processing into a component of food systems for the population of the Arctic and the Far North. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):371-382. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.929. EDN: OWECVD.

ВВЕДЕНИЕ

Высокая биологическая активность бетулина (рис. 1), разнообразие производных, представляющих интерес для пищевой, фармацевтической, парфюмерной и химической промышленности, доступная сырьевая база, высокие коэффициенты извлечения наряду с простотой технологических решений обуславливают интерес к этому тритерпеноиду лупанового ряда на протяжении последних трех десятилетий [1].

Исследованиями отечественных и зарубежных ученых установлено, что введение бетулина в свободном состоянии, в виде бетулинсодержащего экстракта или в составе комплексных пищевых добавок в продукты питания не только улучшает качество и увеличивает биологическую ценность, но и продлевает срок хранения продуктов, а разнообразная физиологическая активность бетулина позволяет разрабатывать специализированные и профилактические продукты питания и напитки, способствующие поддержанию здоровья

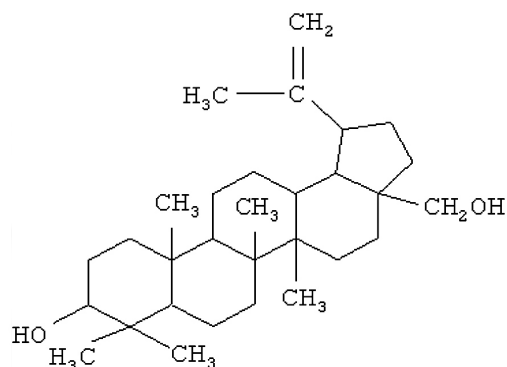


Рис. 1. Структурная формула бетулина

Fig. 1. Structural formula of betulin

населения, проживающего в регионах с экстремальными климатическими условиями – Арктики и Крайнего Севера [2–6]. Так, в АО «Якутский хлебокомбинат» (г. Якутск) выпускается в промышленных масштабах хлеб с бетулином [7], Институтом биологических проблем криолитозоны СО РАН (г. Якутск) на основе бетулина и ягеля разработана и реализуется в аптеках Якутии биологически активная добавка к пище «Бетукладин» [8], что свидетельствует о востребованности бетулина на отечественном рынке микронутриентов. Тем не менее, несмотря на то, что около 80% насаждений березы расположено на территории России, показатели производства бетулина в нашей стране составляют менее 5% от общемировых¹ [9]. Производство продуктов переработки бересты экстракционным способом налажено в ООО «Берёзовый мир» (г. Москва), ООО «БетулаФарм» (г. Пермь), ООО «Кортекс» (г. Тюмень), НПО «Экодика» (г. Киров), ООО «БЕТУВИТА» (г. Омск), АО «Аметис» (г. Благовещенск) и др. При этом их стоимость в пересчете на бетулин составляет в среднем 4,5 тыс. руб. за 100 г (данные российских маркетплейсов, 2024 г.), с учетом рекомендуемой дозировки (0,01%) увеличение стоимости 1 кг пищевого продукта в сравнении с традиционными консервантами – сорбиновой кислотой (Е200), низином (Е234), бензосорбом – составит не более 4 руб.

Бетулин ($C_{30}H_{50}O_2$) представляет собой белый кристаллический порошок без запаха с $T_{пл.} = 261\text{--}262\text{ }^{\circ}\text{C}$, содержание которого в бересте может достигать 40% от массы экстрагируемых веществ [10]. Бетулин растворим в толуоле, этилацетате, низших спиртах, не растворим в воде, не гигроскопичен, способен возгоняться, окисляется до бетулиновой и бетулоновой кислот [11, 12]. На этих свойствах основаны известные в настоящее время способы получения бетулина, ключевой стадией которых является экстракция из растительной биомассы [13]. Диффузионные процессы описываются законом Фика, согласно которому градиент концентрации растворенного вещества зависит от степени измельчения сырья, типа экстрагента, продолжительности, давления, температуры процесса и гидродинамических условий, создаваемых в экстракторе. Перечисленные факторы в полном объеме можно реализовать только при условии интенсификации процесса экстракции.

Для увеличения эффективности массообменных процессов используют следующие способы интенсификации: микроволновая обработка в сверхвысокочастотном поле [14, 15], в условиях низкочастотного пневмопульсационного режима [16] и ультразвукового воздействия [17], тонкопленочная парофазная экстракция [18], механохимическая твердофазная экстракция [19], использование в качестве экстрагента (субкритической) воды и этанола [20], вакуумная сублимация и вакуумный пиролиз [21], суперкритическая флюидная экстракция диоксидом углерода [22, 23]. Немаловажную роль при этом играет и предварительная обработка растительного сырья, направленная на обеспечение последующего ускоренного доступа экстрагента к экстрагируемой клетке, которая осуществляется следующими способами: кратковременное воздействие перегретым паром [24],

активация в условиях «взрывного» автогидролиза бересты в присутствии щелочи [25], в условиях ультразвукового воздействия [26], а также путем комбинации различных методов [19, 27].

Несмотря на многообразие перечисленных современных методов экстракции для реализации в производственных масштабах наиболее востребованы методы, отличающиеся простотой технологических решений и минимальными затратами на производство, например экстракция в условиях автоклавирования. Интенсификация процесса обусловлена воздействием избыточного давления при непрерывном перемешивании растительной биомассы, которое ускоряет диффузию экстрагента по порам и капиллярам частиц бересты, заполняя клетки и другие пустоты в сырье за счет сжатия находящегося в них газа в соответствии с законом Ле Шателье – Брауна. Как правило, при экстракции в условиях избыточного давления необходимо учитывать продолжительность экспозиции, температуру, гидромодуль, природу и концентрацию растворителя, степень измельчения сырья, создаваемое давление и другие факторы [28]. В результате серии экспериментов показано, что увеличение выхода бетулина наблюдается при уменьшении размера частиц бересты, увеличении продолжительности и гидромодуля при постоянстве температуры экстракции и давления. Однако для уточнения условий автоклавирования необходимо провести оптимизацию процесса.

В связи с этим целью проведенного исследования являлась оптимизация процесса извлечения бетулина из *Betula pendula* Roth. для использования в пищевых системах нутрициологической поддержки населения, проживающего в регионах с экстремальными климатическими условиями, методом математического моделирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве исходного сырья использовали внешнюю часть коры (бересту) березы (*Betula pendula* Roth.), заготовленную в летние месяцы 2015–2021 гг. в предгорной зоне Алтайского края. Доброкачественность и усредненные данные по химическому составу бересты, % масс., были следующими: вода – 2,45, экстрактивные вещества – 33,22, бетулин – 21,92, дубильные вещества в пересчете на танин – 3,00, гидроксикоричные кислоты в пересчете на кофейную кислоту – 0,80, зола (общая) – 0,77 [29].

Для экстракции предварительно подготовленного растительного сырья методом периодической экстракции бетулина в динамических условиях бересту заливали экстрагентом (этиловый спирт), перемешивали и загружали в металлическую гильзу качающегося автоклава (не более 2/3 объема). На панели управления выставляли температуру экстракции 70 $^{\circ}\text{C}$. Технические характеристики автоклава качающегося представляли собой: рабочий объем – 3 л, рабочее давление – 60 ат, температурный диапазон – до 300 $^{\circ}\text{C}$ [30]. По окончании процесса массу сливали на фильтр и далее обрабатывали традиционным способом [11].

¹ Производство бетулина и бетулиносодержащих биодобавок (БАД) для людей и животных // Бизнес платформа. Режим доступа: <https://old.business-platform.ru/projects/p28760/> (дата обращения: 27.03.2024).

Регистрацию ИК-спектра поглощения бетулина осуществляли в таблетках KBr на Фурье-спектрометре ФТ-18 (Bruker, Германия) в области длин волн 4000–400 см⁻¹; Элементный анализ выполняли методом сжигания на элементном анализаторе Flash EA (Thermo Quest, Италия).

Для определения оптимальных условий выделения бетулина из бересты березы в условиях автоклавирования была проведена математическая оптимизация процесса экстракции с использованием программного пакета для статистического анализа Statistica 10 (StatSoft, США).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для систематизации полученных экспериментальных данных, а также возможности прогнозирования технологического процесса экстракции было осуществлено математическое моделирование выхода бетулина (основной контролируемый параметр – выход бетулина Y).

Изменение выхода бетулина Y , %, рассмотрено в зависимости от размера частиц бересты X_1 , мм, гидро модуля X_2 и продолжительности экстракции X_3 , мин. Для этих факторов были выбраны основные уровни и интервалы варьирования (табл. 1).

Проверку однородности дисперсий осуществляли по рассчитанному G -критерию Кохрена согласно формуле (1):

$$G_m = \frac{(S_i^2)_{\max}}{\sum_{i=1}^N S_i^2}, \quad (1)$$

где S_i^2 – выборочная дисперсия i -го образца в каждой серии экспериментов; N – количество серий, $N = 3$.

Результаты эксперимента по проверке его воспроизводимости представлены в табл. 2.

Рассчитанное по формуле (1) значение G -критерия Кохрена составило 0,54, табличное значение $G_{\text{табл.}} = 0,975$. Так как $G_m < G_{\text{табл.}}$, измерения в эксперименте следует считать воспроизводимыми.

Исходными данными для регрессионного анализа является выход бетулина, который меняется в зависимости от указанных ранее значимых параметров: размера частиц бересты (X_1 , мм), гидро модуля (X_2) и продолжительности экстракции (X_3 , мин). Уравнение

регрессии (2) имеет следующий вид:

$$Y = 19,35 - 0,8X_1 + 2,8X_2 + 3X_3 - 0,5X_1X_2 - 0,1X_1X_3 + 1,9X_2X_3 - 0,15X_1X_2X_3. \quad (2)$$

После проверки статистической значимости коэффициентов уравнение регрессии (3) имеет вид:

$$Y = 19,35 - 0,8X_1 + 2,8X_2 + 3X_3 + 1,9X_2X_3. \quad (3)$$

Проверка гипотезы об адекватности модели основана на расчетах дисперсии адекватности $S_{\text{ад}}^2$ (4) и критерия Фишера (6):

$$S_{\text{ад}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{\varphi_{\text{ад}}}, \quad (4)$$

где $\hat{y}_i$ – значение параметра оптимизации, рассчитанное по модели для условий i -го опыта; $\varphi_{\text{ад}}$ – число степеней свободы, связанное с дисперсией адекватности (5):

$$\varphi_{\text{ад}} = N - (k + 1) = 8 - (4 + 1) = 3, \quad (5)$$

где k – число значимых коэффициентов.

Результаты расчета параметров оптимизации представлены в табл. 3.

Определяем критерий Фишера:

$$F_p = \frac{S_{\text{ад}}^2}{S_y^2} = \frac{0,753}{0,348} = 2,16. \quad (6)$$

При уровне значимости $\alpha = 0,05$ для трехфакторного эксперимента ($\varphi_y = 3$) табличное значение критерия Фишера составляет 6,59. Расчетное значение меньше табличного: $2,16 < 6,59$, гипотеза об адекватности модели принимается, модель считается адекватной.

Таким образом, зависимость содержания бетулина (Y) от размера частиц (X_1), гидро модуля (X_2) и продолжительности автоклавирования (X_3) описывается следующим уравнением регрессии:

$$Y = 19,35 - 0,8X_1 + 2,8X_2 + 3X_3 + 1,9X_2X_3. \quad (7)$$

Таблица 1. Значение уровней факторов и интервалов варьирования экстракции бетулина

Table 1. Significance of factor levels and variation intervals for betulin extraction

Показатель	Фактор X_1		Фактор X_2		Фактор X_3	
	Натуральное значение	Кодированное значение	Натуральное значение	Кодированное значение	Натуральное значение	Кодированное значение
Основной уровень	16,5×16,5	0	1:13	0	90	0
Нижний уровень	3,0×3,0	-1	1:20	-1	30	-1
Верхний уровень	30,0×30,0	+1	1:5	+1	150	+1

Таблица 2. Результаты проверки воспроизводимости опытов

Table 2. Results of testing the repeatability of experiments

Серия	Номер опыта	Фактор X_1	Фактор X_2	Фактор X_3	Значение Y_i	$\hat{y}$, г	S_i^2
1	1	1	1	1	27,5	27,63	0,37
	2	1	1	1	27,1		
	3	1	1	1	28,3		
2	1	-1	-1	-1	16,8	16,63	0,32
	2	-1	-1	-1	16,0		
	3	-1	-1	-1	17,1		

Таблица 3. Результаты расчета параметра оптимизации

Table 3. Optimization parameter calculation results

Номер опыта	Y_2 эксп., г	$\hat{Y}_i$	$ y - \hat{y} $	$ y - \hat{y} ^2$
1	25,5	26,25	0,75	0,5625
2	16,2	16,45	0,25	0,0625
3	17,4	16,85	0,55	0,3025
4	15,1	14,65	0,45	0,2025
5	28,6	27,85	0,75	0,5625
6	18,3	18,05	0,25	0,0625
7	17,9	18,45	0,55	0,3025
8	15,8	16,25	0,45	0,2025
$S_{ад}^2$				0,753

Максимальный выход бетулина наблюдается при следующих параметрах: размер частиц 3×3 мм; гидромодуль 1:5; продолжительность 150 мин.

Анализ полученного уравнения позволяет сделать вывод, что на выход бетулина оказывают влияние все изучаемые факторы. По данному уравнению были построены поверхности отклика, которые изображены

на рис. 2–4. Линии уровня соответствуют определенным значениям результирующего критерия.

Таким образом, по результатам оптимизации процесса экстракции в условиях автоклавирования определены следующие параметры: гидромодуль 1:5; размер частиц 3×3 мм; продолжительность процесса 150 мин.

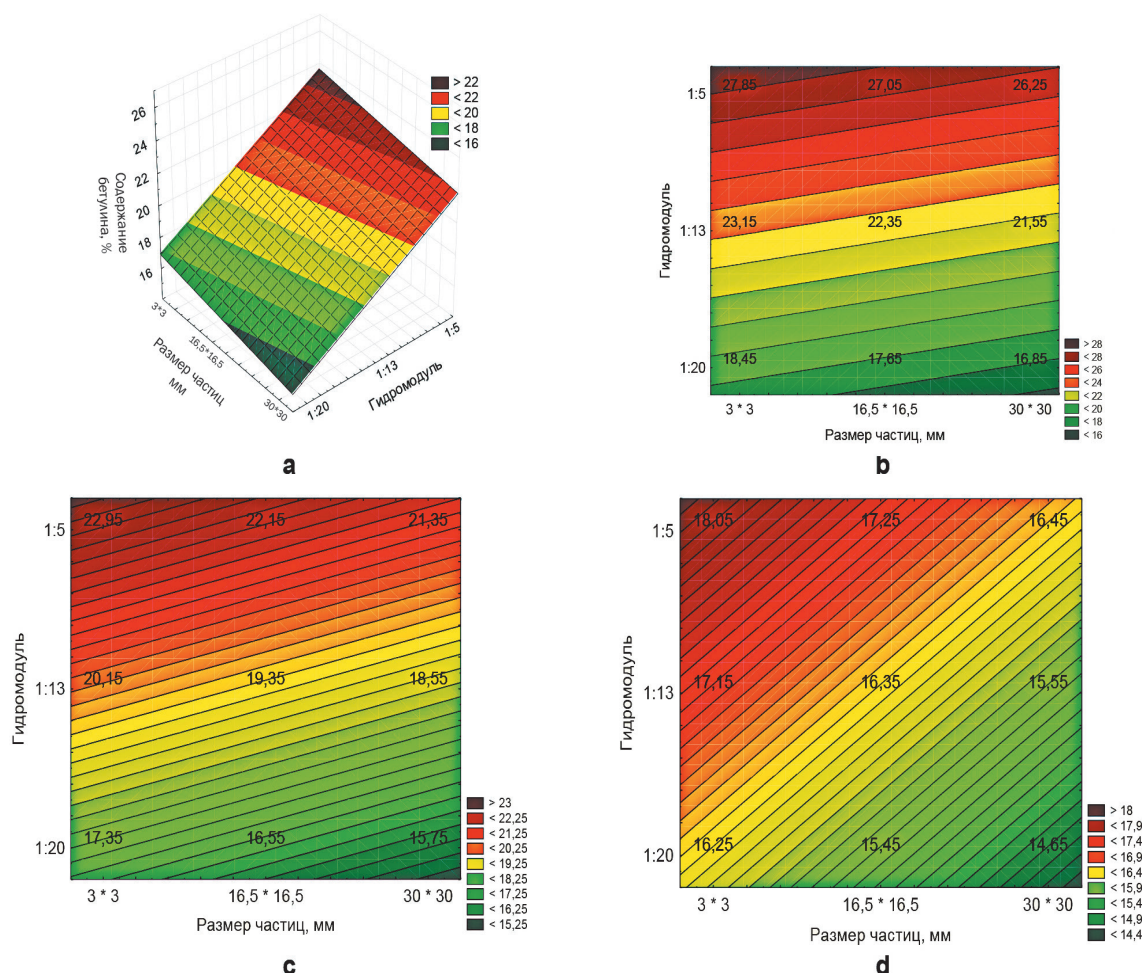


Рис. 2. Зависимость содержания бетулина (Y) от условий экстракции: а – от размера частиц (X_1) и гидромодуля (X_2); б – от размера частиц (X_1) и гидромодуля (X_2) при продолжительности экстракции 150 мин; с – от размера частиц (X_1) и гидромодуля (X_2) при продолжительности экстракции 90 мин; d – от размера частиц (X_1) и гидромодуля (X_2) при продолжительности экстракции 30 мин

Fig. 2. Dependence of betulin content (Y) on extraction conditions: a – on particle size (X_1) and hydromodulus (X_2); b – on particle size (X_1) and hydromodulus (X_2) with an extraction duration of 150 min; c – on particle size (X_1) and hydromodulus (X_2) with an extraction duration of 90 min; d – on particle size (X_1) and hydromodulus (X_2) with an extraction duration of 30 min

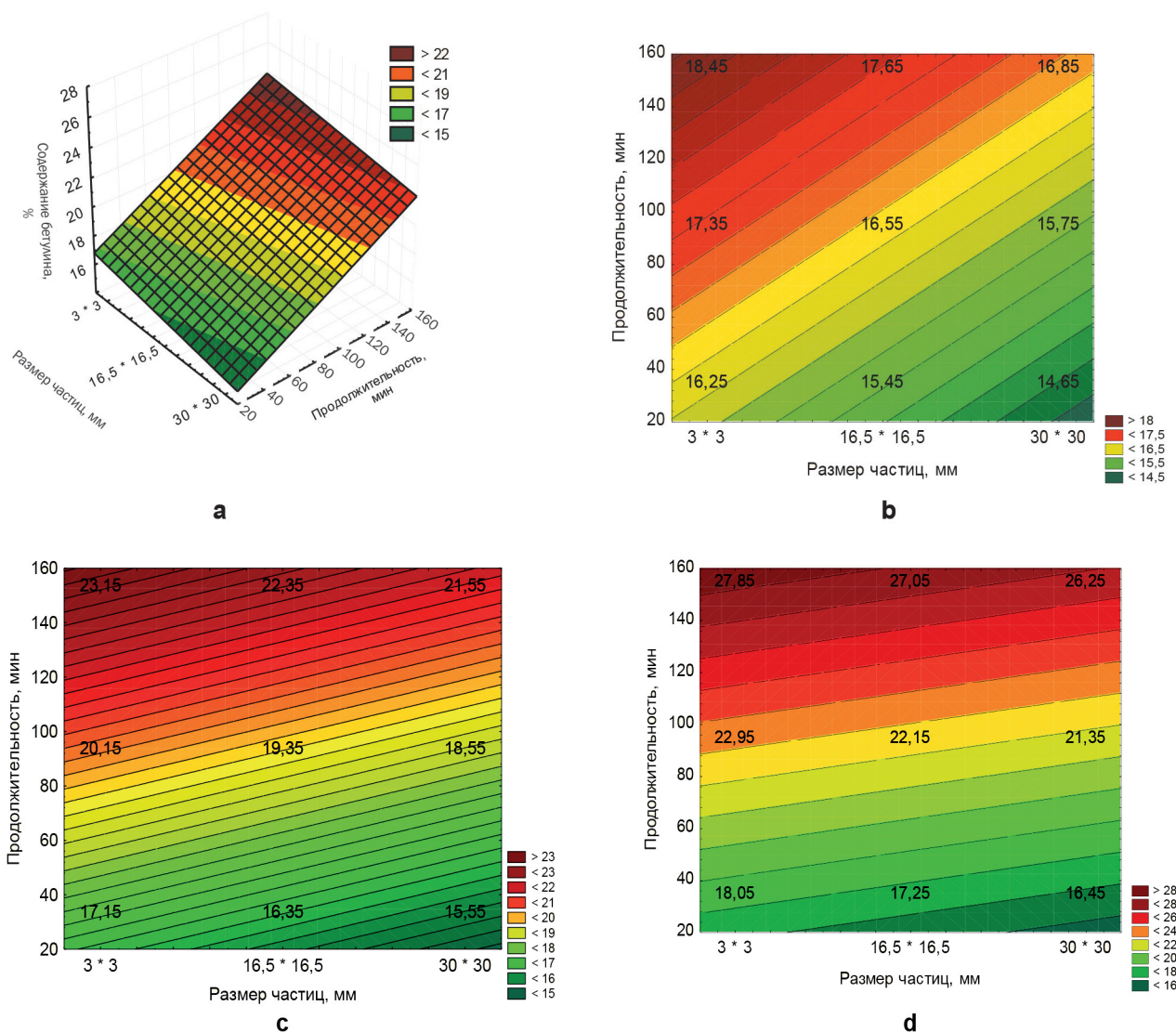


Рис. 3. Зависимость содержания бетулина (Y) от условий экстракции: а – от размера частиц (X₁) и продолжительности экстракции (X₃); б – от размера частиц (X₁) и продолжительности экстракции (X₃) при гидромодуле 1:20; в – от размера частиц (X₁) и продолжительности экстракции (X₃) при гидромодуле 1:13; д – от размера частиц (X₁) и продолжительности экстракции (X₃) при гидромодуле 1:5

Fig. 3. Dependence of betulin content (Y) on extraction conditions: а – on particle size (X₁) and extraction duration (X₃); б – on particle size (X₁) and extraction duration (X₃) at a hydromodulus of 1:20; в – on particle size (X₁) and extraction duration (X₃) at a hydromodulus of 1:13; д – on particle size (X₁) and extraction duration (X₃) at a hydromodulus of 1:5

Выход бетулина при реализации экстракции с оптимальными параметрами в качающемся автоклаве составил 97,5±0,5%; температура плавления 259–260 °С (из этанола); данные ИК-спектроскопии, см⁻¹: 3374,42 (О-Н), 2939,92 (С-Н)_s и 1029,57 (С-О), что соответствует литературным данным [3]. По результатам элементного анализа найдено, %: С – 81,2, Н – 11,5, О – 7,2; вычислено для С₃₀H₅₀O₂, %: С – 81,4, Н – 11,3, О – 7,2. Указанные результаты свидетельствуют о подлинности полученного бетулина.

Так как содержание бетулина в бересте берез белостовольных пород, произрастающих на всей территории Российской Федерации от Архангельска до Дальнего

Востока, отличается незначительно, то предложенный подход к его извлечению применим для бетулинсодержащего сырья, заготовленного в любом регионе.

Бетулин относится к веществам с низкой токсичностью [8], безопасность применения которого в качестве микронутриента подтверждена экспериментально. Результаты исследования гигиенических требований безопасности бетулина представлены в табл. 4 и не превышают значений, регламентированных ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» (приложение 3, п. 10)².

В ряде исследований доказано антиоксидантное, адаптогенное и консервирующее действие бетулина в

² ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/902320560?ysclid=m0ni44y3e4464350568> (дата обращения: 27.03.2024).

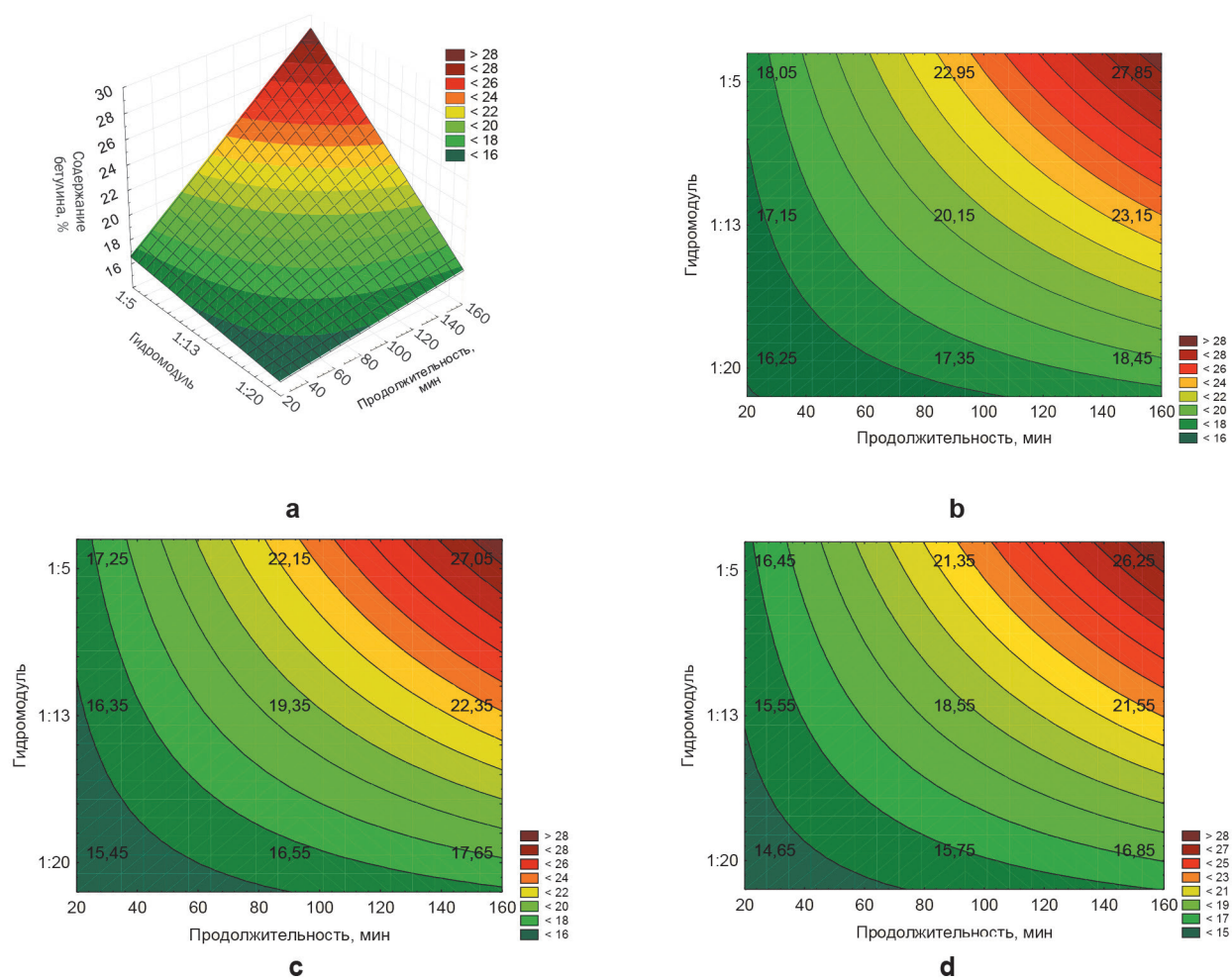


Рис. 4. Зависимость содержания бетулина (Y) от условий экстракции: а – от гидромодуля (X_2) и продолжительности экстракции (X_3); б – от гидромодуля (X_2) и продолжительности экстракции (X_3) при размере частиц 3×3 мм; с – от гидромодуля (X_2) и продолжительности экстракции (X_3) при размере частиц 16,5×16,5 мм; d – от гидромодуля (X_2) и продолжительности экстракции (X_3) при размере частиц 30×30 мм

Fig. 4. Dependence of betulin content (Y) on extraction conditions: a – on hydromodulus (X_2) and extraction duration (X_3); b – on the hydromodulus (X_2) and the duration of extraction (X_3) with a particle size of 3×3 mm; c – on the hydromodulus (X_2) and extraction duration (X_3) with a particle size of 16.5×16.5 mm; d – on the hydraulic module (X_2) and extraction duration (X_3) with a particle size of 30×30 mm

Таблица 4. Показатели безопасности бетулина

Table 4. Safety indicators of betulin

Показатель	Норма по ТР ТС 021/2011, мг/кг, не более	Фактические данные, мг/кг
Свинец	5,0	Менее 0,020
Мышьяк	3,0	Менее 0,001
Кадмий	1,0	Менее 0,001
Ртуть	1,0	Менее 0,001
Дихлордифенил-трихлорэтан и его метаболиты	0,1	Не обнаружено
Гексахлоран (α , β , γ -изомеры)	0,1	Не обнаружено
Гептахлор	Не допускается	Не обнаружено
Алдрин	Не допускается	Не обнаружено

составе пищевых продуктов: молока и молочных продуктов [31], мясных изделий [32], жиросодержащих продуктов (растительного масла, майонеза, сливочного крема) [33], рыбных продуктов [34], хлебобулочных изделий [35] и т.п., что однозначно свидетельствует о значительном потенциале бетулина как компонента пищевых систем, в том числе для потребителей климатических зон Арктики и Крайнего Севера, территория которых является неблагоприятной по заболеваемости гемоконтактными гепатитами [8] и инфекционно-простудными заболеваниями в результате ослабления иммунной системы [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенного исследования оптимизирован процесс экстракции бетулина из бересты березы этанолом в условиях автоклавирования. Методом математического моделирования процесса определены следующие параметры: гидромодуль 1:5; размер

частиц бересты 3×3 мм; продолжительность процесса 150 мин. Выход бетулина при реализации экстракции с оптимальными параметрами в качающемся автоклаве составил 97,5±0,5%, подлинность и безопасность образцов подтверждены экспериментально. Доказанная многочисленными исследованиями физиологическая активность бетулина и примеры его использования в составе

различных пищевых систем для пролонгирования срока хранения свидетельствуют о возможности применения бетулина в качестве природного консерванта и функционального компонента – антиоксиданта для обогащения продуктов питания, в частности предназначенных для населения Арктики и Крайнего Севера.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Adepoju F.O. Duru K.C., Li E., Kovaleva E.G., Tsurkan M.V. Pharmacological potential of betulin as a multitarget compound // *Biomolecules*. 2023. Vol. 13, no. 7. P. 1105. DOI: 10.3390/biom13071105.
2. Преснова Г.А., Тюрина Н.А. Бетулинсодержащий экстракт бересты – натуральный ингредиент для создания специализированных продуктов питания // *Хлебопродукты*. 2016. N 3. С. 32–33. EDN: VMNNDH.
3. Буракова Л.Н., Плотикинов Д.А. Анализ работ в области разработки продуктов функционального назначения, обладающих иммуномодулирующими свойствами // *Ползуновский вестник*. 2021. N 3. С. 117–122. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2021.03.016. EDN: GLWQVS.
4. Zavorokhina N.V., Pankratieva N.A., Goncharova N.A. Betulin nanosuspension as a promising raw material for the production of long-term storage bread // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020. Vol. 548. P. 082017. DOI: 10.1088/1755-1315/548/8/082017.
5. Azman N.A.M., Skowrya M., Muhammad K., Gallego M.G., Almajano M.P. Evaluation of the antioxidant activity of *Betula pendula* leaves extract and its effects on model foods // *Pharmaceutical Biology*. 2017. Vol. 55, no. 1. P. 912–919. DOI: 10.1080/13880209.2017.1282528.
6. Zhang W., Jiang H., Yang J., Jin M., Du Y., Sun Q., et al. Safety assessment and antioxidant evaluation of betulin by LC-MS combined with free radical assays // *Analytical Biochemistry*. 2019. Vol. 587. P. 113460. DOI: 10.1016/j.ab.2019.113460.
7. Жуков М.А., Кершенгольц Б.М., Куваев А.В. Традиционное природопользование на Севере – технологическая культура Арктической субцивилизации: от прошлого к будущему // *Природные ресурсы Арктики и Субарктики*. 2023. Т. 28. N 4. С. 574–583. DOI: 10.31242/2618-9712-2023-28-4-574-583. EDN: HGLJGB.
8. Кершенгольц Б.М., Шашурин М.М., Слепцова С.С., Винокурова М.К., Колосова О.Н. Биопрепарат из природного северного биосырья и возможности его использования при профилактике, лечении и на этапе ремиссии после перенесенных бактериальных и вирусных инфекций, включая COVID-19 // *Природные ресурсы Арктики и Субарктики*. 2021. Т. 26. N 3. С. 120–135. DOI: 10.31242/2618-9712-2021-26-3-120-135. EDN: JHYCCF.
9. Салыхов С.А., Фомина О.А. Перспективы производства в Тюменской области бетулина с использованием луба березы бородавчатой (*Betula verrucosa*) // *Достижения молодежной науки для агропромышленного комплекса: сб. материалов LVI науч.-практ. конф. (г. Тюмень, 14–18 марта 2022 г.)*. Тюмень: Изд-во ГАУ Северного Зауралья, 2022. С. 491–497. EDN: TGVZTU.
10. Сафина А.В., Абдуллина Д.Р., Сафин Р.Г., Арсланова Г.Р., Валеев К.В. Энерго- и ресурсосберегающая технология экстрагирования бетулина из отходов бересты березы // *Лесной вестник*. 2021. Т. 25. N 4. С. 99–106. DOI: 10.18698/2542-1468-2021-4-99-106. EDN: EZYQCM.
11. Кузнецова С.А., Скворцова Г.П., Маяр Ю.Н., Скурыдина Е.С., Веселова О.Ф. Выделение бетулина из бересты березы и изучение его физико-химических и фармакологических свойств // *Химия растительного сырья*. 2013. N 2. С. 93–100. EDN: RCYKPV.
12. Król S.K., Kiełbus M., Rivero-Müller A., Stepulak A. Comprehensive review on betulin as a potent anticancer agent // *Biomed Research International*. 2015. P. 1–11. DOI: 10.1155/2015/584189.
13. Enkh-Amgalan L., Munkhgerel L., Bayarmaa B. Chemical and technological investigation on the isolation of betulin from birch bark // *Bulletin of the Institute of Chemistry and Chemical Technology*. 2020. Vol. 8. P. 38–41. DOI: 10.5564/bicct.v0i8.1476.
14. Коптелова Е.Н., Кутакова Н.А., Третьяков С.И., Фалева А.В. Кинетические закономерности процесса водно-щелочного гидролиза березовой коры в СВЧ-поле // *Известия высших учебных заведений. Лесной журнал*. 2022. N 3. С. 179–190. DOI: 10.37482/0536-1036-2022-3-179-190. EDN: KCBNZN.
15. Takibaeva A.T., Kasenov R.Z., Demets O.V., Zhumadilov S.S., Bakibaev A.A. Derive betulin from Kyrgyz birch bark (*Betula kirghisorum*) through alkaline hydrolysis and microwave radiation methods // *Доклады Национальной академии наук Республики Казахстан*. 2021. N 4. С. 87–92. DOI: 10.32014/2021.2518-1483.63.
16. Пат. № 2524778, Российская Федерация, МПК C07J 53/00, C07J 63/00. Способ получения бетулина / Е.Л. Мальчиков, А.Н. Кислицын, 2014. Заявл. 28.03.2013; опубл. 10.08.2014. Бюл. № 22.
17. Chen H., Xiao H., Pang J. Parameter optimization and potential bioactivity evaluation of a betulin extract from white birch bark // *Plants*. 2020. Vol. 9, no. 3. P. 392. DOI: 10.3390/plants9030392.
18. Жук В.В., Яновский В.А., Самбуева О.Б., Бакибаев А.А. Технология получения бетулина методом тонкоплочной парофазной экстракции // *Химия растительного сырья*. 2014. N 3. С. 247–253. DOI: 10.14258/jcprm.1403247. EDN: TGUFHH.
19. Панкрушина Н.А., Ломовский О.И., Шахтштейндер Т.П. Физическая активация процессов экстракции и органического синтеза // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2019. Т. 27. N 6. С. 704–715. DOI: 10.15372/KhUR2019194. EDN: TYNADY.
20. Co M., Koskela P., Eklund-Åkergren P., Srinivas K., King J.W., Sjöberg P.J., et al. Pressurized liquid extraction of betulin and antioxidants from birch bark // *Green Chemistry*. 2009. Vol. 11, no. 5. P. 668–674. DOI: 10.1039/B819965E.
21. Demets O.V. Takibayeva A.T., Kassenov R.Z., Aliyeva M.R. Methods of betulin extraction from birch bark // *Molecules*. 2022. Vol. 27, no. 11. P. 3621. DOI: 10.3390/molecules27113621.

- 22.** Patent no. 6634575, USA. Birch bark processing and isolation of natural products from birch bark / P.A. Kratsutsky, R.M. Carlson, V.V. Nesterenko, I.M. Kolomitsyn, C.F. Edwardson. 2003.
- 23.** Zhang Y., Yu T., Wang Y. Extraction of betulin from bark of *Betula platyphylla* by supercritical carbon dioxide extraction // Journal of Forestry Research. 2003. Vol. 14, no. 3. P. 202–204. DOI: 10.1007/BF02856830.
- 24.** Кузнецов Б.Н., Кузнецова С.А., Левданский В.А., Судакова И.Г., Веселова О.Ф. Совершенствование методов выделения, изучение состава и свойств экстрактов березовой коры // Химия в интересах устойчивого развития. 2005. Т. 13. N 3. С. 391–400. EDN: HRVEVT.
- 25.** Кузнецов Б.Н., Левданский В.А., Полежаева Н.И. Экстракция бетулина низшими алифатическими спиртами из внешней коры березы *Betula Pendula Roth.*, активированной перегретым паром в присутствии щелочи // Химия растительного сырья. 2004. N 2. С. 21–24. EDN: НУРQX.
- 26.** Пат. № 2640587, Российская Федерация. Способ получения бетулина / Е.В. Аверьянова, М.Н. Школьников, С.Н. Цыганок, В.Н. Хмелев, В.А. Шакура. Заявл. 09.02.2017; опубл. 10.01.2018. Бюл. № 1.
- 27.** Akhmetova D.A., Fakhrutdinov R.R., Prokofieva A.A. Overview of betulin extraction technologies from birch bark and birch bark // Наука и технологии в лесопромышленном комплексе: сб. науч. тр. Междунар. науч.-практ. конф. (г. Брянск, 20–21 июля 2023 г.). Брянск: Изд-во БГИТУ, 2023. С. 9–12. EDN: НЮКFI.
- 28.** Дубашинская Н.В., Хишова О.М., Шимко О.М. Некоторые особенности экстрагирования лекарственного растительного сырья (часть I) // Вестник фармации. 2006. N 4. С. 62–72. EDN: KZJJZB.
- 29.** Аверьянова Е.В., Школьников М.Н. Повышение эффективности бетулинсодержащих пищевых ингредиентов из бересты березы повислой (*Betula Pendula Roth.*) в составе пищевых систем // Химия растительного сырья. 2022. N 4. С. 333–341. DOI: 10.14258/jcrpm.20220411171. EDN: GGNJYT.
- 30.** Полезная модель № 2518, РФ. Качающийся автоклав с электрообогревом для проведения гетерогенных процессов / В.А. Куничан, Г.И. Севодина, В.П. Севодин, Ю.Н. Денисов, В.М. Буров. Заявл. 06.07.1994; опубл. 16.08.1996.
- 31.** Юферова А.А., Сударева М.А., Дубняк Я.В. Применение природных антиоксидантов в технологии молочных продуктов // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания. 2021. N 2. С. 98–107. DOI: 10.24412/2311-6447-2021-2-98-107. EDN: HZPPIF.
- 32.** Гаптар С.Л., Сороколетов О.Н., Тарабанова Е.В., Кошелева Е.А., Лисиченок О.В., Головкин А.Н. Расширение ассортиментной линейки пищевых продуктов специализированного назначения и функциональной направленности // Инновации и продовольственная безопасность. 2021. N 4. С. 55–67. DOI: 10.31677/2072-6724-2021-34-4-56-67. EDN: MVJEGJ.
- 33.** Базарнова Ю.Г. Биотехнологический потенциал сухого экстракта бересты и возможности его использования в технологии продуктов здорового питания // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2015. N 2. С. 59–65. EDN: TXJCSD.
- 34.** Альраджаб М., Шульгина Л.В., Приходько Ю.В., Касьянов С.П. Технология и характеристика диетического продукта на основе икры горбуши и жира сардины иваси // Известия Дальневосточного федерального университета. Экономика и управление. 2021. N 3. С. 100–107. DOI: 10.24866/2311-2271/2021-3/99-106. EDN: BUIPEQ.
- 35.** Шевелева Т.А. Нетрадиционное растительное сырье в рецептурах хлебобулочных изделий // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2021. Т. 167. N 2. С. 143–150. DOI: 10.36718/1819-4036-2021-2-143-150. EDN: BPHMKF.

REFERENCES

- 1.** Adepoju F.O., Duru K.C., Li E., Kovaleva E.G., Tsurkan M.V. Pharmacological potential of betulin as a multitarget compound. *Biomolecules*. 2023;13(7):1105. DOI: 10.3390/biom13071105.
- 2.** Presnova G.A., Tyurina N.A. Betulin-containing birch bark extract is a natural ingredient for creating specialized food products. *Khleboprodukty*. 2016;3:32–33. (In Russian). EDN: VMNNHD.
- 3.** Burakova L.N., Plotnikov D.A. Analysis of studies on development of functional products with immunomodulatory properties. *Polzunovskiy vestnik*. 2021;3:117–122. (In Russian). DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2021.03.016. EDN: GLWQVS.
- 4.** Zavorokhina N.V., Pankratieva N.A., Goncharova N.A. Betulin nanosuspension as a promising raw material for the production of long-term storage bread. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2020;548:082017. DOI: 10.1088/1755-1315/548/8/082017.
- 5.** Azman N.A.M., Skowrya M., Muhammad K., Gallego M.G., Almajano M.P. Evaluation of the antioxidant activity of *Betula pendula* leaves extract and its effects on model foods. *Pharmaceutical Biology*. 2017;55(1):912–919. DOI: 10.1080/13880209.2017.1282528.
- 6.** Zhang W., Jiang H., Yang J., Jin M., Du Y., Sun Q., et al. Safety assessment and antioxidant evaluation of betulin by LC-MS combined with free radical assays. *Analytical Biochemistry*. 2019;587:113460. DOI: 10.1016/j.ab.2019.113460.
- 7.** Zhukov M.A., Kershengolts B.M., Kuvaev A.V. Traditional nature management in the North as a technological culture of the Arctic subcivilization: from past to future. *Arctic and Subarctic Natural Resources*. 2023;28(4):574–583. (In Russian). DOI: 10.31242/2618-9712-2023-28-4-574-583. EDN: HGLJGB.
- 8.** Kershengolts B.M., Shashurin M.M., Sleptcova S.S., Vinokurova M.K., Kolosova O.N. Biological product from natural northern biological raw materials with possible use in the prevention, treatment and remission stages after bacterial and viral infections, including COVID-19. *Arctic and Subarctic Natural Resources*. 2021;26(3):120–135. (In Russian). DOI: 10.31242/2618-9712-2021-26-3-120-135. EDN: JHYCCF.
- 9.** Salakhov S.A., Fomina O.A. Prospects for the production of betulin in the tyumen region using warty birch bast (*Betula verrucosa*). In: *Dostizheniya molodezhnoi nauki dlya agropromyshlennogo kompleksa: sb. materialov LVI nauch.-prakt. konf. = Achievements of youth science for the agro-industrial complex: Proc. 56th Sci. Pract. Conf.* 14–18 March 2022, Tyumen. Tyumen: Northern

Trans-Ural State Agricultural University; 2022, p. 491-497. (In Russian). EDN: TGVZTU.

10. Safina A.V., Abdullina D.R., Safin R.G., Arslanova G.R., Valeev K.V. Energy-saving technology for betulin extraction from birch bark waste. *Forestry Bulletin*. 2021;4(25):99-106. (In Russian). DOI: 10.18698/2542-1468-2021-4-99-106. EDN: EZYQCM.

11. Kuznetsova S.A., Skvortsova G.P., Maliar Iu.N., Skurydina E.S., Veselova O.F. Extraction betulin from birch bark and study of its physicochemical and pharmacological properties. *Chemistry of plant raw material*. 2013;2:93-100. (In Russian). EDN: RCYKPV.

12. Król S.K., Kielbus M., Rivero-Müller A., Stepulak A. Comprehensive review on betulin as a potent anticancer agent. *Biomed Research International*. 2015:1-11. DOI: 10.1155/2015/584189.

13. Enkh-Amgalan L., Munkhgerel L., Bayarmaa B. Chemical and technological investigation on the isolation of betulin from birch bark. *Bulletin of the Institute of Chemistry and Chemical Technology*. 2020;8:38-41. DOI: 10.5564/bicct.v0i8.1476.

14. Koptelova E.N., Kutakova N.A., Tret'yakov S.I., Faleva A.V. Kinetics of water-alkaline hydrolysis of birch bark in a microwave field. *Russian Forestry Journal*. 2022;3:179-190. (In Russian). DOI: 10.37482/0536-1036-2022-3-179-190. EDN: KCBNZN.

15. Takibaeva A.T., Kasenov R.Z., Demets O.V., Zhumadilov S.S., Bakibaev A.A. Derive betulin from Kyrgyz birch bark (*Betula kirghisorum*) through alkaline hydrolysis and microwave radiation methods. *Reports of NAS RK*. 2021;4:87-92. DOI: 10.32014/2021.2518-1483.63.

16. Mal'chikov E.L., Kisilitsyn A.N. *Method of producing betulin*. Patent RF, no. 2524778; 2014. (In Russian).

17. Chen H., Xiao H., Pang J. Parameter optimization and potential bioactivity evaluation of a betulin extract from white birch bark. *Plants*. 2020;9(3):392. DOI: 10.3390/plants9030392.

18. Zhuk V.V., Ianovskii V.A., Sambueva O.B., Bakibaev A.A. Technology of thin-film method betulin vapor-phase extraction. *Chemistry of plant raw material*. 2014;3:247-253. (In Russian). DOI: 10.14258/jcprm.1403247. EDN: TGUFHH.

19. Pankrushina N.A., Lomovsky O.I., Shakhtshneider T.P. Physical activation of extraction and organic synthesis processes. *Chemistry for Sustainable Development*. 2019;27(6):704-715. (In Russian). DOI: 10.15372/KhUR2019194. EDN: TYNADY.

20. Co M., Koskela P., Eklund-Åkergren P., Srinivas K., King J.W., Sjöberg P.J., et al. Pressurized liquid extraction of betulin and antioxidants from birch bark. *Green Chemistry*. 2009;11(5):668-674. DOI: 10.1039/B819965E.

21. Demets O.V., Takibayeva A.T., Kasenov R.Z., Aliyeva M.R. Methods of betulin extraction from birch bark. *Molecules*. 2022;27(11):3621. DOI: 10.3390/molecules27113621.

22. Krasutsky P.A., Carlson R.M., Nesterenko V.V., Kolomitsyn I.M., Edwardson C.F. *Birch bark processing and isolation of natural products from birch bark*. Patent USA, no. 6634575; 2003.

23. Zhang Y., Yu T., Wang Y. Extraction of betulin from bark of *Betula platyphylla* by supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Forestry Research*. 2003;14(3):202-204. DOI: 10.1007/BF02856830.

24. Kuznetsov B.N., Kuznetsova S.A., Levanskii V.A., Sudakova I.G., Veselova O.F. Improving isolation methods, studying the composition and properties of birch bark extracts. *Chemistry for Sustainable Development*. 2005;3(13):391-400. (In Russian). EDN: HRVEVT.

25. Kuznetsov B.N., Levanskii V.A., Polezhaeva N.I. Betulin extraction with lower aliphatic alcohols from the outer bark of the birch *Betula Pendula* Roth., activated by superheated steam in the presence of alkali. *Chemistry of plant raw material*. 2004;2:21-24. (In Russian). EDN: HYPYQX.

26. Averyanova E.V., Shkolnikova M.N., Tsyganok S.N., Khmelev V.N., Shakura V.A. *Method for obtaining betulin*. Patent RF no. 2640587; 2018. (In Russian).

27. Akhmetova D.A., Fakhrutdinov R.R., Prokofieva A.A. Overview of betulin extraction technologies from birch bark and birch bark. *Nauka i tekhnologii v lesopromyshlennom komplekse: sb. nauch. tr. Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. = Science and technology in the forest industry: Proc. Int. Sci. Pract. Conf.* 20–21 July 2023, Bryansk. Bryansk: Bryansk State Technological University Of Engineering; 2023, p. 9-12. (In Russian). EDN: HJYKFI.

28. Dubashinskaya N.V., Khishova O.M., Shimko O.M. Some features of the extraction of medicinal plant materials (part I). *Vestnik farmatsii*. 2006;4:62-72. (In Russian). EDN: KZJJZB.

29. Averyanova E.V., Shkolnikova M.N. Improving the efficiency of betulin-containing food ingredients from silver birch (*Betula Pendula* Roth.) in food systems. *Chemistry of plant raw material*. 2022;4:333-341. (In Russian). DOI: 10.14258/jcprm.20220411171. EDN: GGNJYT.

30. Kunichan V.A., Sevodina G.I., Sevodin V.P., Denisov Ju.N., Burov V.M. *Oscillating autoclave with electrical heating for heterogeneous processes*. Utility model RF, no. 2518; 1996. (In Russian).

31. Yuferova A.A., Sudareva B.A., Dubnyak Y.V. The use of natural antioxidants in dairy technology. *Tekhnologii pishchevoi i pererabatyvayushchei promyshlennosti APK – produkty zdorovogo pitaniya*. 2021;2:98-107. (In Russian). DOI: 10.24412/2311-6447-2021-2-98-107. EDN: HZPPIF.

32. Gaptar S.L., Sorokoletov O.N., Tarabanova E.V., Kosheleva E.A., Lisichenok O.V., Golovko A.N. Expanding the range of food products for special purpose and functionality. *Innovations and Food Safety*. 2021;4:55-67. (In Russian). DOI: 10.31677/2072-6724-2021-34-4-56-67. EDN: MVJEGJ.

33. Bazarnova U.G. Dry birchbark extractsbiotechnological potentialand possibilities of itsusing in the healthy foodtechnology. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2015;2:59-65. (In Russian). EDN: TXJCSD.

34. Al'rajab M., Shulgina L.V., Prikhodko Yu.V., Kas'janov S.P. Technology and characteristics of a diet product based on human bear caviar and fat of sardinops melanostictus. *The Bulletin of the Far Eastern Federal University. Economics and Management*. 2022;3:100-107. (In Russian). DOI: 10.24866/2311-2271/2021-3/99-106. EDN: BUIPEQ.

35. Sheveleva T.L. Nonconventional vegetable raw materials in bakery recipes. *Bulletin of KrasGAU*. 2021;2:143-150. (In Russian). DOI: 10.36718/1819-4036-2021-2-143-150. EDN: BPHMKF.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Школьникова Марина Николаевна,

д.т.н., доцент,
ведущий научный сотрудник,
Алтайский государственный технический
университет им. И. И. Ползунова,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
профессор,
Уральский государственный
экономический университет,
620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта / Народной
Воли, 62/45, Российская Федерация,
tp@usue.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9146-6951>

Павлов Игорь Николаевич,

к.т.н., доцент, доцент,
Бийский технологический институт (филиал)
Алтайского государственного технического
университета им. И.И. Ползунова,
659305, г. Бийск, ул. Имени Героя Советского Союза
Трофимова, 27, Российская Федерация,
pavlov.in@bti.secna.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4883-5325>

Аверьянова Елена Витальевна,

д.т.н., доцент, ведущий научный сотрудник,
Алтайский государственный технический
университет им. И. И. Ползунова,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
✉ averianova.ev@bti.secna.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2144-1238>

Рожнов Евгений Дмитриевич,

д.т.н.,
научный сотрудник,
Алтайский государственный технический
университет им. И. И. Ползунова,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
профессор,
Уральский государственный
экономический университет,
620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта / Народной
Воли, 62/45, Российская Федерация,
tp@usue.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3982-9700>

Чугунова Ольга Викторовна,

д.т.н., профессор,
заведующий кафедрой,
Уральский государственный
экономический университет,
620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта / Народной
Воли, 62/45, Российская Федерация,
tp@usue.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3982-9700>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Marina N. Shkolnikova,

Dr. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Leading Researcher,
Polzunov Altai State Technical University,
46, Lenin Ave., Barnaul, 656038,
Russian Federation,
Professor,
Ural State University of Economics,
62/45, 8 Marta St. / Narodnaya Volya,
Yekaterinburg, 620144, Russian Federation,
tp@usue.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9146-6951>

Igor N. Pavlov,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Associate Professor,
Biysk Technological Institute (Branch)
of the Altay State Technical University,
27, Hero of the Soviet Union Trofimov St., Biysk,
659305, Russian Federation,
pavlov.in@bti.secna.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4883-5325>

Elena V. Averyanova,

Dr. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Leading Researcher,
Polzunov Altai State Technical University,
46, Lenin Ave., Barnaul, 656038,
Russian Federation,
✉ averianova.ev@bti.secna.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2144-1238>

Evgeny D. Rozhnov,

Dr. Sci. (Engineering),
Researcher,
Polzunov Altai State Technical University,
46, Lenin Ave., Barnaul, 656038,
Russian Federation,
Professor,
Ural State University of Economics,
62/45, 8 Marta St. / Narodnaya Volya,
Yekaterinburg, 620144, Russian Federation,
tp@usue.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3982-9700>

Olga V. Chugunova,

Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Head of Department,
Ural State University of Economics,
62/45, 8 Marta St. / Narodnaya Volya,
Yekaterinburg, 620144, Russian Federation,
tp@usue.ru
<https://orcid.org/0000-0002-3982-9700>

Вклад авторов

М.Н. Школьников – разработка концепции исследования, руководство исследованием, написание и редактирование рукописи.
И.Н. Павлов – обработка и анализ полученных данных.
Е.В. Аверьянова – проведение экспериментального исследования, написание рукописи.
Е.Д. Рожнов – информационный поиск, оформление статьи.
О.В. Чугунова – проведение аналитического исследования, написание статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 01.04.2024.
Одобрена после рецензирования 31.07.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

Contribution of the authors

Marina N. Shkolnikova – conceptualization and supervision of the study, writing and editing the manuscript.
Igor N. Pavlov – processing and analysis of the data obtained.
Elena V. Averyanova – conducting experiments and writing the manuscript.
Evgeny D. Rozhnov – information search, article design.
Olga V. Chugunova – conducting analytical research, writing the manuscript.

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 01.04.2024.
Approved after reviewing 31.07.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.

Научная статья
УДК 663.437
EDN: XNVZXA
DOI: 10.21285/achb.937



Экстракт ламинарии слоевища сушеного (*Laminaria thalli*) как средство стимулирования прорастания и переваримости овса и гречихи

А.В. Снегирева*✉, Л.Е. Мелёшкина*, О.Н. Мусина***

*Алтайский государственный технический университет им И.И. Ползунова,
Барнаул, Российская Федерация

***Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Барнаул, Российская Федерация

Аннотация. Зерновые культуры, несмотря на свои полезные свойства, содержат ряд антипитательных веществ, одним из методов снижения содержания которых является проращивание. Научный и прикладной интерес представляет проверка гипотезы о возможности стимулирования прорастания зерновых культур (на примере овса и гречихи) и повышения их переваримости путем использования при проращивании сушеного слоевища ламинарии (*Laminaria thalli*) в форме экстракта. Объектами проведенного исследования являлись овес голозерный (*Avena nudisativa*) для проращивания и обрушенное зерно гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum*), а также сушеные *Laminaria thalli*. Проращивание осуществляли при температуре (20 ± 2) °C в течение 120 часов, используя воду питьевую (контроль) и воду питьевую с добавлением 1% от массы навески зерна сушеных слоевищ ламинарии. Стимулирование прорастания оценивали комплексно: по массе 1000 зерен, длине ростка и количеству проросших зерен. Во всех образцах определяли массовую долю экстрактивных веществ и переваримость сухого вещества с модификациями. Установлено, что добавление к воде 1% от массы навески культуры сушеного слоевища ламинарии достоверно стимулирует прорастание овса и гречихи, а также их переваримость. Экспериментальные образцы демонстрируют лучшее водопоглощение, увеличение массы 1000 зерен, длину ростка и количество проросших зерен. Использование экстракта сушеных *Laminaria thalli* при проращивании в пищевых целях овса и гречихи позволяет сократить технологический процесс до двух суток с одновременным увеличением переваримости и минимизацией потерь экстрактивных веществ.

Ключевые слова: зерновка овса, обрушенное зерно гречихи, ламинарии слоевище сушеное, *Laminaria thalli*, переваримость

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки Российской Федерации (№ 075-03-2024-105, номер темы FZMM-2024-0003, рег. № НИОКТР 124013000666-5).

Для цитирования: Снегирева А.В., Мелёшкина Л.Е., Мусина О.Н. Экстракт ламинарии слоевища сушеного (*Laminaria thalli*) как средство стимулирования прорастания и переваримости овса и гречихи // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 383–393. DOI: 10.21285/achb.937. EDN: XNVZXA.

Dried *Laminaria thalli* extract for stimulating germination and digestibility of oats and buckwheat

Anna V. Snegireva*✉, Larisa E. Meleshkina*, Olga N. Musina***

*Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russian Federation

**Federal Altai Scientific Centre of Agro-BioTechnologies, Barnaul, Russian Federation

Abstract. Despite their beneficial properties, cereal crops contain a number of antinutritive substances, the amount of which can be reduced by germination. In this work, we test the hypothesis about the possibility of stimulating the germination of cereal crops (on the example of oats and buckwheat) and increasing their digestibility using a dried *Laminaria thalli* extract. The research was conducted using hullless oats (*Avena nudisativa*) for germination and hulled buckwheat grain (*Fagopyrum esculentum*), as well as dried *Laminaria thalli*. Germination was carried out at a temperature of (20 ± 2) °C for 120 h, using drinking water (control) and drinking water with addition of 1 wt% of dried kelp thalli. The germination intensity was assessed based on the mass of 1000 grains, sprout length, and the number of germinated grains. In all samples, the mass fraction of extractive substances and dry matter digestibility with modifications were determined. It was found that the addition of dried *Laminaria thalli* to water in the amount of 1 wt% stimulates the germination of oats and buckwheat, as well as their digestibility, significantly. The experimental samples demonstrated an improved water absorption and an increase in the weight of 1000 grains, sprout length, and the number of germinated grains. The use of dried *Laminaria thalli* extract in germination of oats and buckwheat for food purposes reduces the technological process up to two days with a simultaneous increase in digestibility and minimization of losses of extractive substances.

Keywords: oat grain, hulled buckwheat grain, dried kelp, *Laminaria thalli*, digestibility

Funding. Ministry of Education and Science of Russian Federation supported this work (no. 075-03-2024-105, topic number FZMM-2024-0003, registration number 124013000666-5).

For citation: Snegireva A.V., Meleshkina L.E., Musina O.N. Dried *Laminaria thalli* extract for stimulating germination and digestibility of oats and buckwheat. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):383-393. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.937. EDN: XNVZXA.

ВВЕДЕНИЕ

Зерновые культуры в питании человека являются ценным источником углеводов, белков, витаминов группы В, а также минеральных веществ и клетчатки, которые содержатся в первую очередь в алейроновом слое. В течение многих лет специалисты в области нутрициологии и медицины подчеркивают важность цельнозерновых продуктов для здоровья человека [1]. В крупах грубого помола присутствуют компоненты, которые обладают большим потенциалом в снижении факторов риска, связанных с различными типами онкологических заболеваний, такими как рак молочной железы, толстой кишки, предстательной железы и другими; антиканцерогенный эффект связан главным образом с действием фенольных соединений [2].

Вместе с тем зерновые культуры содержат ряд антипитательных факторов, которые препятствуют усвоению незаменимых нутриентов. Наиболее распространенные антипитательные вещества, присутствующие в растительном материале, включают сапонины, дубильные вещества, фитаты, полифенольные соединения и ингибиторы протеаз. Эти компоненты влияют на питательную ценность крупяных продуктов, препятствуя перевариванию белков, усвоению железа и ряда макро- и микронутриентов, вплоть до появления интоксикации

при попадании в организм человека в высоких концентрациях. В настоящее время в пищевой отрасли для инактивации таких пищевых антинутриентов используется несколько стратегий, которые включают в себя обработку зерновых культур, такую как измельчение, замачивание, проращивание, автоклавная и микроволновая обработка и ферментация [3]. Также известно применение гидростатического давления, импульсных электрических полей, ультразвука и холодной плазмы [4]. В исследованиях установлено, что холодная плазма оказывает значительное влияние на антипитательные факторы, например на ингибиторы трипсина и содержание фитиновой кислоты в бобах мунг [5]. Ко всему прочему, изучено комплексное воздействие микроволнового облучения и проращивания на зерно татарской гречихи [6, 7], проращивания и экструзии на зерно пшеницы [8].

Во время проращивания синтезируются эндогенные ферменты, что оказывает существенное влияние на химический состав и технологические характеристики растительного сырья. Повышается пищевая ценность и усвояемость, в процессе ферментации значительно снижается количество антинутриентов, содержащихся в злаках, таких как фитаты, полифенолы, дубильные вещества и ингибиторы трипсина [9, 10], увеличивается

количество свободных жирных кислот [11] и содержание флавоноидов. Среди различных методов обработки зерновых и крупяных культур проращивание может быть использовано для повышения антиоксидантного потенциала функциональных продуктов питания, что актуально для терапии различных хронических заболеваний, вызванных свободными радикалами (метаболический синдром, ожирение, сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания и др.) [12]. Доказано, что проращивание гречихи приводит к увеличению ее антиоксидантной активности [13]. Также сообщается об увеличении после проращивания в течение 72 ч антиоксидантной активности муки из татарской гречихи в результате большего накопления свободных флавоноидов и фенольных кислот: наибольший прирост наблюдался в катехинах, кемпфероле, витексине, п-кумаровой кислоте; также отмечено увеличение содержания незаменимых аминокислот: лизина, лейцина и фенилаланина [14]. Доказано, что мука из пророщенного овса является отличным источником белка (10,7%), β -глюкана (2,1%), тиамина (687,1 мкг/100 г), рибофлавина (218,4 мкг/100 г) и минералов (фосфора, калия, магния и кальция), имеет лучший аминокислотный и жирнокислотный составы и уровни γ -аминомасляной кислоты (54,9 мг/100 г), свободных фенольных соединений (507,4 мг ГА/100 г) и антиоксидантной способности (1744,3 мг ТЕ/100 г) в сравнении с непророщенным овсом [15]. Установлено, что при проращивании гречихи в течение 48 ч общее содержание незаменимых аминокислот и полиненасыщенных жирных кислот увеличивается на 5,22 и 3,66% соответственно по сравнению с аналогичными показателями у непророщенной гречихи [16]. При проращивании гречихи антипитательные компоненты, такие как танин и фитиновая кислота, снижаются на 59,91 и 17,42% соответственно [17].

Зарубежные исследователи приходят к выводу, что проращивание может быть использовано в качестве эффективного метода биотрансформации злаков для получения модифицированной муки пищевого назначения с улучшенными нутритивными характеристиками и способствовать повышению скорости переваривания углеводов и белков [18]. Кроме того, проращивание облегчает ферментацию злаков с использованием пробиотических микроорганизмов [19]. При исследовании муки из различных пророщенных зерновых культур отмечено снижение коэффициента набухания, что связано с гидролизом крахмала и белков [20]. В результате изучения процесса прорастания ржи установлено, что в течение первых трех дней общая протеолитическая активность увеличивается и в целом картина гидролиза схожа с той, которая наблюдается при проращении пшеницы и ячменя [21]. Небольшое снижение массовой доли белка в зерне в процессе прорастания также может свидетельствовать о повышении протеолитической активности ферментов [22]. Доказано, что проращивание зерновых культур приводит к увеличению содержания витаминов и повышению биодоступности железа и цинка [23]. Объемная и истинная плотность имеют тенденцию к снижению во время гидратации, а удельная площадь поверхности зерен уменьшается из-за трехмерного расширения зерна [24]. Установлено влияние температуры на

процесс прорастания и антиоксидантный потенциал зерна [25, 26].

Известно, что использование при проращивании йода (в виде калия йодида) приводит к увеличению энергии и способности прорастания семян [27].

Перспективным природным источником йода при проращивании может являться ламинария (*Laminaria thalli*), содержащая помимо йода еще комплекс других микро- и макронутриентов. В состав ламинарии входят йод, калий, магний, кальций и железо, соединения йода, в частности ТЕА-гидроидид, являются отличными липолитическими агентами, поскольку они стимулируют активность липазы [28]. В 100 г сухой ламинарии содержится 17,1–32,0 г альгиновой кислоты, 8,46–28,48 г маннита, 5,97–18,99 г сырого протеина и 19,35–45,29 г общей золы, в том числе 0,13–0,69 г йода и 4,35–12,65 г калия, энергетическая ценность составляет 262 ккал [29]. Экстракты ламинарии обладают антиоксидантной активностью [30], оказывают положительное влияние на микробиоту кишечника и стимулируют потерю веса, регулируют метаболизм аминокислот в кишечнике и гликометаболизм, защищая кишечный барьер [31]. Добавление ламинарии в пищевые продукты приводит к увеличению содержания фенольных соединений и хлорофиллов [32].

Установлено положительное влияние ламинарии на процесс прорастания нута: происходит лучшее водопоглощение, увеличивается количество проросших зерен, массовая доля экстрактивных веществ, повышается пищевая ценность, усвояемость и переваримость нута как в желудке, так и в кишечнике [33].

Таким образом, благодаря своему богатому химическому составу ламинария может не только служить потенциальным стимулятором проращивания, но и обогатить готовый продукт незаменимыми нутриентами.

Научный и прикладной интерес представляет проверка гипотезы о возможности стимулирования прорастания зерновых культур на примере овса (*Avena nudisativa*) и гречихи (*Fagopyrum esculentum*), а также повышения их переваримости путем использования при проращивании ламинарии в форме экстракта сушеного слоевища (*Laminaria thalli*).

В связи с вышесказанным целью проведенного исследования явилась разработка метода для ускорения проращивания зерновых культур (на примере овса и гречихи) и улучшения их переваримости.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Проведение исследований осуществлялось на лабораторной базе Центра комплексных исследований и экспертной оценки пищевой продукции «АлтайБиоЛакт» Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова (г. Барнаул, Россия).

В качестве объектов исследования использовали следующие образцы сырья и пищевой продукции, которые соответствовали требованиям действующей нормативной документации:

- овес голозерный (*Avena nudisativa*) под торговым наименованием «Овес голозерный для проращивания» по ТУ 9719-011-89751414-10 (далее по тексту – овес);
- гречиха посевная (*Fagopyrum esculentum*) под торговым наименованием «Гречка зеленая для проращивания» по СТО 64350476-0019-2016 (далее по

тексту – гречиха); согласно ГОСТ 19092-2021¹ данный вид сырья относится к обрубленному зерну гречихи;

– сушеные слоевища ламинарии (*Laminaria thalli*) по ТУ 15-01 206-79 (далее по тексту – ламинария).

Следует отдельно остановиться на дефинициях. Как известно, к зерновым культурам относят однодольные растения семейства мятликовых (злаков), в том числе овес, а также гречиху из семейства гречишных. В биологии плод овса называется голая или пленчатая зерновка, а гречихи – трехгранный орешек. В нормативной документации аграрной отрасли, пищевой и перерабатывающей промышленности принят обобщенный стандартизированный термин «зерно» (ГОСТ 28673-2019², ГОСТ Р 56105-2014³). Поскольку в настоящей работе изучаются возможности оптимизации процесса проращивания овса и гречихи для пищевых нужд, представляется целесообразным использовать терминологию государственных стандартов пищевой отрасли – «зерно».

В качестве субстратов для проращивания использовали воду питьевую (контроль) и воду питьевую с добавлением сушеных слоевищ ламинарии в количестве 1% от массы навески зерна. Проращивание проводилось при температуре (20 ± 2) °C в течении 120 ч согласно ГОСТ 10968-88⁴.

Стимулирование прорастания оценивали комплексно: по массе 1000 зерен, количеству проросших зерен и длине ростка.

В процессе проращивания определение массы 1000 зерен при фактической влажности производилось по ГОСТ ISO 520-2014⁵.

Пробоподготовка для определения количества проросших зерен проводилась согласно методике, изложенной в ГОСТ 10968-88⁴. Подсчеты при этом проводились ежедневно в одно и то же время в двух повторностях по 500 зерен.

Далее определяли влияние продолжительности проращивания и вида субстрата на длину ростка. В течение всего времени проращивания каждые 24 часа отбирали 100 случайных зерен, измеряли длину ростка поверенной измерительной линейкой и рассчитывали среднее арифметическое M с указанием среднеквадратического отклонения $\pm SD$.

Определение влажности пророщенного зерна производилось по ГОСТ 13586.5-2015⁶.

Переваримость сухого вещества определяли по ГОСТ 24230-80⁷ со следующими модификациями: для имитации процесса переваривания пищи в кишечнике использовали щелочной раствор пепсина (в 1 дм³ дистиллированной воды растворяли 2 г пепсина и добавляли гидрокарбонат натрия до достижения pH 7,2–7,5) и не использовали целлюлазу.

Массовую долю экстрактивных веществ в пересчете

на сухое вещество оценивали по методике, изложенной в ГОСТ 12136-77⁸.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для активного протекания биохимических процессов в живом организме, как известно, необходима влага. Водопоглощительная способность зерна зависит от его строения и химического состава. Вместе с тем химический состав субстрата, на котором происходит проращивание, возможно, тоже влияет на изменение массовой доли влаги в зерне и нарастание массы. Для оценки корректности этого предположения изучено нарастание массы 1000 зерен при фактической влажности. При этом с появлением в процессе проращивания ростков и корней зерно взвешивали вместе с ними. Результаты исследования представлены на рис. 1. Из графика видно, что наибольшую массу имеет 1000 зерен после 48 ч проращивания, что связано с интенсивным накоплением влаги в растительной биомассе. После окончания фазы водопоглощения и набухания в зерне запускаются процессы прорастания, усиливается дыхание, увеличивается активность ферментов и начинается активный гидролиз запасных веществ, что сопровождается делением и ростом клеток зародыша, появлением ростков. Небольшое снижение массы 1000 зерен отмечено на третьи сутки. Гидролиз биополимеров сопровождается их перемещением из запасной ткани в проросток, что является процессом, требующим затрат энергии и усиления дыхания зерна. Далее длина ростков заметно увеличивается, начинают преобладать процессы синтеза и органогенеза, что приводит к увеличению массы 1000 зерен. Установлено, что в зерне, пророщенном с использованием ламинарии, водопоглощение происходит в целом активнее. Вероятно, это связано с наличием в субстрате йода. При набухании зерна повышается проницаемость мембран, что приводит к активной диффузии ионов водорастворимого йода из внешней водной среды во внутреннее пространство семян. Под воздействием йода также увеличивается масса 1000 зерен.

Известно, что ламинария содержит целый комплекс полисахаридов, которые являются гелеобразующими и применяются в качестве загустителей и эмульгаторов. Растения накапливают альгиновую кислоту в виде солей кальция, магния и железа. Альгинат натрия обладает высокой студнеобразующей способностью, а также эффективно уменьшает поверхностное натяжение. Альгинат натрия имеет способность набухать в воде до полного растворения, альгинат кальция в воде не растворяется, но имеет способность к набуханию, при

¹ ГОСТ 19092-2021. Гречиха. Технические условия. М.: Российский институт стандартизации, 2021. 16 с.

² ГОСТ 28673-2019. Овес. Технические условия. М.: Стандартинформ, 2019. 11 с.

³ ГОСТ Р 56105-2014. Гречиха. Технические условия. М.: Стандартинформ, 2019. 6 с.

⁴ ГОСТ 10968-88. Зерно. Методы определения энергии прорастания и способности прорастания. М.: Стандартинформ, 2009. 4 с.

⁵ ГОСТ ISO 520-2014. Зерновые и бобовые. Определение массы 1000 зерен. М.: Стандартинформ, 2015. 12 с.

⁶ ГОСТ 13586.5-2015. Зерно. Метод определения влажности. М.: Стандартинформ, 2019. 16 с.

⁷ ГОСТ 24230-80. Корма растительные. Метод определения переваримости in vitro. М.: Издательство стандартов, 2003. 4 с.

⁸ ГОСТ 12136-77. Зерно. Метод определения экстрактивности ячменя. М.: Стандартинформ, 2009. 5 с.

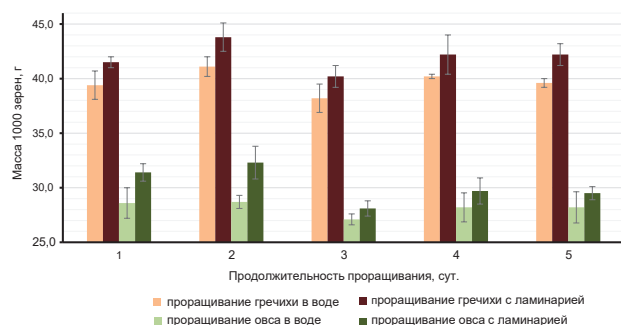


Рис. 1. Влияние продолжительности проращивания и вида субстрата на массу 1000 зерен при фактической влажности

Fig. 1. Effect of germination duration and type of substrate on the weight of 1000 grains at actual humidity

этом связывая воду 200-кратно собственной массой. Такие свойства альгинатов широко используются в пищевых добавках, повышающих водоудерживающую способность. Исходя из этого можно предположить, что альгинаты, растворимые в воде, способны образовывать пленки на поверхности зерен, тем самым препятствовать испарению влаги, что также сказывается на увеличении массы 1000 зерен, пророщенных в воде с использованием ламинарии. Поступающая влага приводит к увеличению содержания воды внутри клеток. Это запускает цепь сложных преобразований в прорастающем зерне, происходит мобилизация запасных веществ, приводящая к изменению свойств биополимеров (белков, крахмала, целлюлозы), которые преобразуются в осмотически активные соединения, осмотический потенциал клеток повышается, что приводит к большему сохранению накопленной влаги в прорастающем зерне. Кроме того, как известно, вода поступает в растительную клетку через липидный бислой мембран и по водным каналам, которые формируют трансмембранные белки аквапорины, способные удерживать воду [34]. Возможно, компоненты ламинарии способны воздействовать на проницаемость клеточных мембран и усиливать гидратацию. При этом ускоряется поступление воды по водным каналам, которые формируют трансмембранные белки аквапорины, что является триггером прорастания. При достижении 18–20% влажности происходит первичная активация дыхания за счет гликолиза и цикла Кребса, а также начинается аминокислотный метаболизм, что достигается приобретением активной конформации соответствующими ферментами при наличии субстратов и их успешной доставке. Также происходит интенсивное растяжение клеток в осевых органах, которое начинается в верхних клетках гипокотили и распространяется вниз на корни [35].

В результате набухания зерно интенсивно дышит, активизируется процесс прорастания, на который значительное влияние оказывает среда проращивания. В связи с этим было проведено исследование влияния продолжительности проращивания и вида среды на количество проросших зерен.

На рис. 2 представлено процентное соотношение проросших зерен в зависимости от продолжительности проращивания и субстрата. Диаграмма показывает, что в первые сутки гречиха прорастает активнее овса и

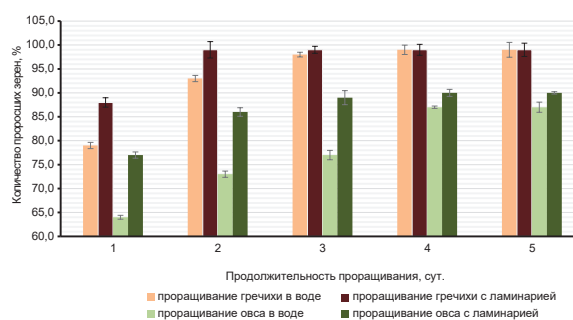


Рис. 2. Влияние продолжительности проращивания и вида субстрата на количество проросших зерен

Fig. 2. Effect of germination duration and type of substrate on the mass fraction of germinated grains

добавление ламинарии интенсифицирует этот процесс. На вторые сутки с ламинарией прорастают практически все зерна гречихи. В последующем показатели равны, а на пятые сутки массовая доля проросших зерен гречихи независимо от вида субстрата составила 99%. На зерно овса наличие ламинарии оказывает аналогичное влияние: на вторые сутки процент проросших зерен овса с ламинарией имеет такое же значение, как овса, пророщенного традиционным способом в течение четырех суток. Таким образом, добавление ламинарии в субстрат дает дополнительное питание зерну, что позволяет увеличить количество проросших зерен.

Помимо количества проросших зерен, которое также зависит от качества самого зерна, показателем эффективности проращивания является длина ростков. В свою очередь, на длину ростка помимо продолжительности проращивания оказывает влияние и вид субстрата (рис. 3). В результате исследований было установлено положительное влияние добавления ламинарии на длину ростка исследованных культур. Наиболее активный рост происходит у гречихи, и уже на вторые сутки росток увеличивается практически в шесть раз. Для достижения таких показателей при традиционном способе проращивания необходимо не менее трех суток. Похожая закономерность наблюдается и у овса, только

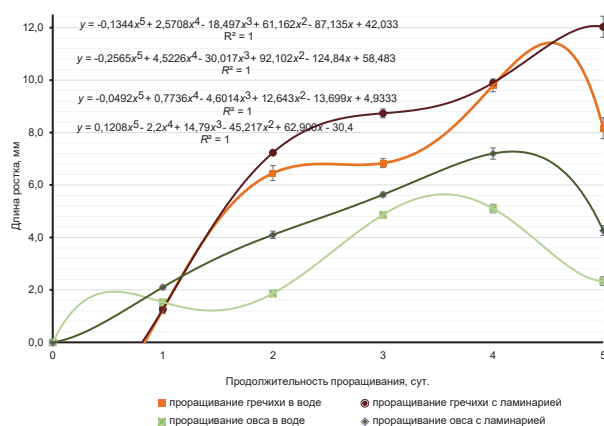


Рис. 3. Влияние продолжительности проращивания и вида субстрата на длину ростка

Fig. 3. Effect of germination duration and type of substrate on sprout length

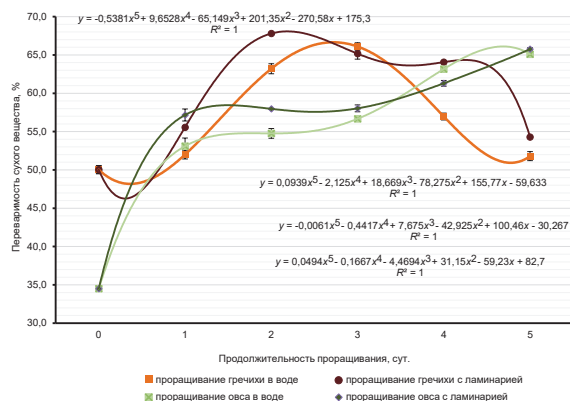


Рис. 4. Влияние продолжительности проращивания и вида субстрата на переваримость сухого вещества зерна

Fig. 4. Effect of germination duration and type of substrate on the digestibility of dry matter

длина его ростков увеличивается примерно в два раза. На пятые сутки наблюдается небольшое снижение на графике, что обусловлено началом процесса подсыхания ростков. Одновременно с этим наблюдается позеленение ростков, что говорит о потере питательной ценности самой зерновки. Кроме того, после трех суток проращивания начинают появляться корни.

Вместе с процессами проращивания происходит активизация ферментативного комплекса зерна, который способствует диссимиляции сложных веществ до более простых, легко усвояемых желудочно-кишечным трактом человека и одновременной инактивации антипитательных веществ. Все это может положительно сказаться на переваримости пророщенного зерна.

Для сравнительного анализа пророщенного и непророщенного зерна по показателю переваримости необходимо провести пробоподготовку. В связи с этим подбирали режимы высушивания пророщенного зерна до влажности не более 14%, обеспечивающей возможность размола. При этом начальная температура сушки составляла 90 °C, однако обработка образцов в течение 40 мин привела к снижению влажности лишь до 23%, в связи с чем было принято решение увеличить температуру до 100 °C. Отбор проб для определения влажности проводили каждые 10 мин, и лишь по истечении 50 мин сушки при 100 °C влажность образцов, пророщенных на разных субстратах в течение различного времени, составила от 7,0 до 10,6%.

Далее непророщенное и пророщенное в различных субстратах зерно подвергали измельчению до крупности частиц не более 1 мм и исследовали на показатель переваримости сухого вещества. Полученные данные графически представлены на рис. 4. Из графика видно, что с увеличением длительности проращивания в стандартных условиях до трех суток у гречихи происходит увеличение переваримости, тогда как использование ламинарии приводит к интенсификации всех биохимических процессов в зерне, в том числе гидролизу белка под действием протеолитических ферментов с образованием свободных аминокислот, инактивации ингибиторов протеаз, в связи с чем показатель переваримости достигает максимума на вторые сутки проращивания.

Дальнейшее проращивание приводит к снижению показателя переваримости, что может быть связано с

образованием большого количества водорастворимых веществ, которые теряются в результате ежедневного промывания.

Положительное влияние ламинарии отражается и на переваримости овса. Здесь резкий рост наблюдается уже после суток проращивания, тогда как без ламинарии такие же значения по показателю переваримости формируются лишь после трех суток. В отличие от гречихи, после первых суток на графике заметна некоторая стабилизация показателя переваримости и небольшое увеличение его на четвертые и пятые сутки, что можно объяснить и предыдущими данными о менее активном прорастании овса.

В процессе проращивания помимо гидролиза белка происходит также гидролиз крахмала до сахаров, накопление водорастворимых витаминов, минеральных веществ, образование растворимых пищевых волокон, что увеличивает содержание экстрактивных веществ. В связи с этим на следующем этапе было исследовано влияние продолжительности проращивания и вида субстрата на показатель экстрактивности в пересчете на сухое вещество в пророщенном зерне (рис. 5). На протяжении всех пяти суток массовая доля экстрактивных веществ увеличивается, что вполне коррелирует с диссимиляцией запасных веществ зерна. В то же время в гречихе, пророщенной с добавлением ламинарии, после трех суток наблюдается снижение экстрактивности, что, скорее всего, обусловлено ассимиляцией образовавшихся при прорастании веществ проростком и отчасти потерей водорастворимых веществ в процессе ежедневного промывания. Использование ламинарии при проращивании овса, в свою очередь, тоже приводит к более интенсивному гидролизу сложных веществ до более простых, используемых на органогенез проростка и корней, а также отчасти теряющихся с промывной водой.

На основании данных о массе 1000 зерен, количестве проросших зерен, длине ростка и переваримости проросших зерен можно сделать вывод, что рациональным методом ускорения проращивания зерновых культур и улучшения их переваримости является использование в комбинации следующих режимов: проращивание овса или гречихи в течение двух суток с использованием в качестве субстрата воды питьевой с добавлением

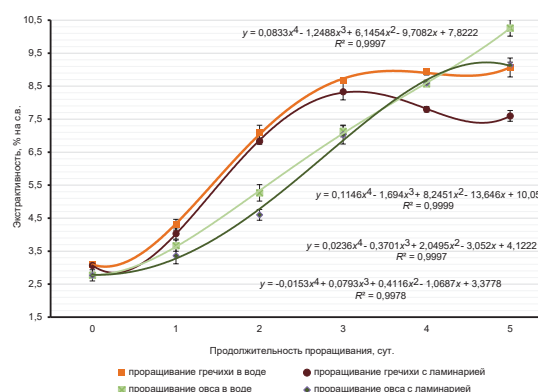


Рис. 5. Влияние продолжительности проращивания и вида субстрата на экстрактивность пророщенного зерна

Fig. 5. Effect of germination duration and type of substrate on the extractivity of sprouted grain

сушеных слоевищ ламинарии в количестве 1% от массы навески зерна. При этом переваримость зерна максимальна, потери экстрактивных веществ минимальны, корни не появились и росток не позеленел, что говорит о возможности использования пророщенного зерна в пищевых целях, в том числе для получения обогащенных и функциональных продуктов питания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что добавление к воде сушеного слоевища ламинарии стимулирует прорастание овса и гречихи, а также их переваримость. Экспериментальные образцы демонстрируют лучшее водопоглощение, увеличение массы 1000 зерен, длины ростка и количества проросших зерен. Массовая доля экстрактивных веществ и переваримость сухого вещества также возрастают.

Рациональным является следующий метод: проращивание овса голозерного (*Avena nudisativa*) или обрушенного зерна гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum*) в течение двух суток при температуре (20±2) °C с использованием в качестве субстрата воды

питьевой с добавлением *Laminaria thalli* в количестве 1% от массы навески зерна. При этом масса 1000 зерен на 6,5% (гречиха) и на 12,5% (овес) больше, чем при традиционном методе проращивания с водой питьевой; количество проросших зерен составляет 99% (гречиха) и 86% (овес), что эквивалентно четырем суткам проращивания традиционным методом; формируется более длинный росток; переваримость сухого вещества гречихи достигает максимума, а овса соответствует значениям, полученным при проращивании в течение не менее трех суток традиционным методом; потери экстрактивных веществ минимальны.

Использование экстракта *Laminaria thalli* при проращивании в пищевых целях овса и гречихи позволяет сократить технологический процесс до двух суток с одновременным увеличением переваримости и минимизацией потерь экстрактивных веществ. Полученные данные могут использоваться в пищевой отрасли в качестве научного базиса при поиске методов ускорения проращивания других зерновых культур и улучшения их переваримости.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Meziani S., Nadaud I., Tasleem-Tahir A., Nurit E., Benguella R., Branlard G. Wheat aleurone layer: a site enriched with nutrients and bioactive molecules with potential nutritional opportunities for breeding // *Journal of Cereal Science*. 2021. Vol. 100. P. 103225. DOI: 10.1016/j.jcs.2021.103225.
2. Zhou H., Cui J., Ma L. Effects of germination and sweet fermented grains fermentation on nutritional quality, starch digestion in vitro and antioxidant properties of oat // *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*. 2021. Vol. 36, no. 9. P. 82–86.
3. Samtiya M., Aluko R.E., Dhewa T. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview // *Food Production, Processing and Nutrition*. 2020. Vol. 2. P. 6. DOI: 10.1186/s43014-020-0020-5.
4. Xia Q., Green B.D., Zhu Z., Li Y., Gharibzahedi S.M.T., Roohinejad S., et al. Innovative processing techniques for altering the physicochemical properties of wholegrain brown rice (*Oryza sativa* L.) – opportunities for enhancing food quality and health attributes // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019. Vol. 59, no. 20. P. 3349–3370. DOI: 10.1080/10408398.2018.1491829.
5. Sadhu S., Thirumdas R., Deshmukh R.R., Annapure U.S. Influence of cold plasma on the enzymatic activity in germinating mung beans (*Vigna radiate*) // *LWT*. 2017. Vol. 78. P. 97–104. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.12.026.
6. Wang S., Wang S., Wang J., Peng W. Label-free quantitative proteomics reveals the mechanism of microwave-induced Tartary buckwheat germination and flavonoids enrichment // *Food Research International*. 2022. Vol. 160. P. 111758. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111758.
7. Ma H., Xu X., Wang S., Wang J., Wang S. Effects of microwave irradiation of *Fagopyrum tataricum* seeds on the physicochemical and functional attributes of sprouts // *LWT*. 2022. Vol. 165. P. 113738. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113738.
8. Zhu L., Adedeji A.A., Alavi S. Effect of germination and extrusion on physicochemical properties and nutritional qualities of extrudates and tortilla from wheat // *Journal of Food Science*. 2017. Vol. 82, no. 8 P. 1867–1875. DOI: 10.1111/1750-3841.13797.
9. Torbica A., Radosavljević M., Belović M., Tamilselvan T., Prabhasankar P. Biotechnological tools for cereal and pseudocereal dietary fibre modification in the bakery products creation – advantages, disadvantages and challenges // *Trends in Food Science & Technology*. 2022. Vol. 129. P. 194–209. DOI: 10.1016/j.tifs.2022.09.018.
10. Geng J., Li J., Zhu F., Chen X., Du B., Tian H., et al. Plant sprout foods: biological activities, health benefits, and bioavailability // *Journal of Food Biochemistry*. 2022. Vol. 46, no. 3. P. 13777. DOI: 10.1111/jfbc.13777.
11. Jiménez D., Lobo M., Irigaray B., Grompone M., Sammán N. Oxidative stability of baby dehydrated purees formulated with different oils and germinated grain flours of quinoa and amaranth // *LWT*. 2020. Vol. 127. P. 109229. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109229.
12. Shah A., Masoodi F.A., Gani A., ul Ashraf Z., Ashwar B.A. Effect of different pretreatments on antioxidant activity of oats grown in the Himalayan region // *Journal of Food Science and Technology*. 2022. Vol. 59. P. 3464–3473. DOI: 10.1007/s13197-021-05336-6.
13. Bae H.-G., Kim M.-J. Antioxidant and anti-obesity effects of in vitro digesta of germinated buckwheat // *Food Science and Biotechnology*. 2022. Vol. 31. P. 879–892. DOI: 10.1007/s10068-022-01086-z.
14. Bhinder S., Singh N., Kaur A. Impact of germination on nutraceutical, functional and gluten free muffin making properties of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) // *Food Hydrocolloids*. 2022. Vol. 124. Pt. A. P. 107268. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.107268.
15. Aparicio-García N., Martínez-Villaluenga C., Frias J., Peñas E. Sprouted oat as a potential gluten-free ingredient with enhanced nutritional and bioactive properties // *Food Chemistry*. 2021. Vol. 338. P. 127972. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127972.
16. Hung P.V., Trinh L.N.D., Thuy N.T.X., Morita N. Changes in nutritional composition, enzyme activities and bioactive compounds of germinated buckwheat (*Fagopyrum esculantum* M.) under unchanged air and humidity conditions // *International Journal of Food Science and Technology*. 2021.

Vol. 56, no. 7. P. 3209–3217. DOI: 10.1111/ijfs.14883.

17. Thakur P., Kumar K., Ahmed N., Chauhan D., Ul Eain Hyder Rizvi Q., Jan S., et al. Effect of soaking and germination treatments on nutritional, anti-nutritional, and bioactive properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.), quinoa (*Chenopodium quinoa* L.), and buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.) // *Current Research in Food Science*. 2021. Vol. 4. P. 917–925. DOI: 10.1016/j.crfs.2021.11.019.

18. Kaur H., Gill B.S. Comparative evaluation of physicochemical, nutritional and molecular interactions of flours from different cereals as affected by germination duration // *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2020. Vol. 14. P. 1147–1157. DOI: 10.1007/s11694-019-00364-5.

19. Budhwar S., Sethi K., Chakraborty M. Efficacy of germination and probiotic fermentation on underutilized cereal and millet grains // *Food Production, Processing and Nutrition*. 2020. Vol. 2. P. 12. DOI: 10.1186/s43014-020-00026-w.

20. Li C., Jeong D., Lee J.H., Chung H.-J. Influence of germination on physicochemical properties of flours from brown rice, oat, sorghum, and millet // *Food Science and Biotechnology*. 2020. Vol. 29. P. 1223–1231. DOI: 10.1007/s10068-020-00770-2.

21. Brijs K., Trogh I., Jones B., Delcour J. A. Proteolytic enzymes in germinating rye grains // *Cereal Chemistry*. 2002. Vol. 79, no. 3. P. 423–428. DOI: 10.1094/CHEM.2002.79.3.423.

22. Kaur H., Gill B.S. Changes in physicochemical, nutritional characteristics and ATR–FTIR molecular interactions of cereal grains during germination // *Journal of Food Science and Technology*. 2021. Vol. 58. P. 2313–2324. DOI: 10.1007/s13197-020-04742-6.

23. Brinch-Pedersen H., Borg S., Tauris B., Holm P.B. Molecular genetic approaches to increasing mineral availability and vitamin content of cereals // *Journal of Cereal Science*. 2007. Vol. 46, no. 3. P. 308–326. DOI: 10.1016/j.jcs.2007.02.004.

24. Carvalho G.R., Polachini T.C., Augusto P.E.D., Telis-Romero J., Bon J. Physical properties of barley grains at hydration and drying conditions of malt production // *Journal of Food Process Engineering*. 2021. Vol. 44, no. 4. P. e13644. DOI: 10.1111/jfpe.13644.

25. Singh A., Bobade H., Sharma S., Singh B., Gupta A. Enhancement of digestibility of nutrients (*in vitro*), antioxidant potential and functional attributes of wheat flour through grain germination // *Plant Foods for Human Nutrition*. 2021. Vol. 76. P. 118–124. DOI: 10.1007/s11130-021-00881-z.

26. Sharma S., Singh A., Singh B. Characterization of *in vitro* antioxidant activity, bioactive components, and

nutrient digestibility in pigeon pea (*Cajanus cajan*) as influenced by germination time and temperature // *Journal of Food Biochemistry*. 2019. Vol. 43, no. 2. P. e12706. DOI: 10.1111/jfbc.12706.

27. Medrano-Macías J., Leija-Martínez P., González-Morales S., Juárez Maldonado A., Benavides-Mendoza A. Use of iodine to biofortify and promote growth and stress tolerance in crops // *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7. P. 1146. DOI: 10.3389/fpls.2016.01146.

28. Kim S.-K., Bhatnagar I. Physical, chemical, and biological properties of wonder kelp – *Laminaria* // *Advances in Food and Nutrition Research*. 2011. Vol. 64. P. 85–96. DOI: 10.1016/B978-0-12-387669-0.00007-7.

29. Bokov D.O., Potanina O.G., Nikulin A.V., Shchukin V.M., Orlova V.A., Bagirova G.B., et al. Modern approaches to the analysis of kelp (*Laminaria* sp.) as pharmacopoeial herbal drugs and food products // *Pharmacognosy Journal*. 2020. Vol. 12, no. 4. P. 929–937. DOI: 10.5530/pj.2020.12.132.

30. Rajauria G., Ravindran R., Garcia-Vaquero M., Rai D.K., Sweeney T., O'Doherty J. Molecular characteristics and antioxidant activity of laminarin extracted from the seaweed species *Laminaria hyperborea*, using hydrothermal-assisted extraction and a multi-step purification procedure // *Food Hydrocolloids*. 2021. Vol. 112. P. 106332. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.106332.

31. Jin Z., Fang Z., Pei Z., Wang H., Zhu J., Lee Y., et al. A low molecular weight brown algae *Laminaria japonica* glycan modulates gut microbiota and body weight in mice // *Food & Function*. 2021. Vol. 12. P. 12606–12620. DOI: 10.1039/d1fo03024h.

32. Amoriello T., Mellara F., Amoriello M., Ceccarelli D., Ciccoritti R. Powdered seaweeds as a valuable ingredient for functional breads // *European Food Research and Technology*. 2021. Vol. 247. P. 2431–2443. DOI: 10.1007/s00217-021-03804-z.

33. Snegireva A.V., Shchetinin M.P., Meleshkina L.E. Chickpea sprouting as a way to increase the garnish nutritional value // *AIP Conference Proceedings*. 2021. Vol. 2419. P. 030005. DOI: 10.1063/5.0068798.

34. Веселовский В.А., Веселова Т.В. Нарушение функции аквапоринов клеточных мембран как причина изменения всхожести семян гороха при действии γ -излучения в малых дозах // *Радиационная биология. Радиозэкология*. 2007. Т. 47. N 1. С. 28–33. EDN: HZLHKT.

35. Обручева Н.В., Синькевич И.А., Литягина С.В., Новикова Г.В. Особенности водного режима при прорастании семян // *Физиология растений*. 2017. Т. 64. N 4. С. 311–320. DOI: 10.7868/S0015330317030137. EDN: YTMHOX.

REFERENCES

1. Mezziani S., Nadaud I., Tasleem-Tahir A., Nurit E., Benguella R., Branlard G. Wheat aleurone layer: a site enriched with nutrients and bioactive molecules with potential nutritional opportunities for breeding. *Journal of Cereal Science*. 2021;100:103225. DOI: 10.1016/j.jcs.2021.103225.

2. Zhou H., Cui J., Ma L. Effects of germination and sweet fermented grains fermentation on nutritional quality, starch digestion *in vitro* and antioxidant properties of oat. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*.

2021;36(9):82–86.

3. Samtiya M., Aluko R.E., Dhewa T. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. *Food Production, Processing and Nutrition*. 2020;2:6. DOI: 10.1186/s43014-020-0020-5.

4. Xia Q., Green B.D., Zhu Z., Li Y., Gharibzadeh S.M.T., Roohinejad S., et al. Innovative processing techniques for altering the physicochemical properties of wholegrain brown rice (*Oryza sativa* L.) – opportunities for enhancing food quality and health attributes. *Critical Reviews in*

Food Science and Nutrition. 2019;59(20):3349-3370. DOI: 10.1080/10408398.2018.1491829.

5. Sadhu S., Thirumdas R., Deshmukh R.R., Annapure U.S. Influence of cold plasma on the enzymatic activity in germinating mung beans (*Vigna radiate*). *LWT*. 2017;78:97-104. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.12.026.

6. Wang S., Wang S., Wang J., Peng W. Label-free quantitative proteomics reveals the mechanism of microwave-induced Tartary buckwheat germination and flavonoids enrichment. *Food Research International*. 2022;160:111758. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111758.

7. Ma H., Xu X., Wang S., Wang J., Wang S. Effects of microwave irradiation of *Fagopyrum tataricum* seeds on the physicochemical and functional attributes of sprouts. *LWT*. 2022;165:113738. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113738.

8. Zhu L., Adedeji A.A., Alavi S. Effect of germination and extrusion on physicochemical properties and nutritional qualities of extrudates and tortilla from wheat. *Journal of Food Science*. 2017;82(8):1867-1875. DOI: 10.1111/1750-3841.13797.

9. Torbica A., Radosavljević M., Belović M., Tamilselvan T., Prabhasankar P. Biotechnological tools for cereal and pseudocereal dietary fibre modification in the bakery products creation – advantages, disadvantages and challenges. *Trends in Food Science & Technology*. 2022;129:194-209. DOI: 10.1016/j.tifs.2022.09.018.

10. Geng J., Li J., Zhu F., Chen X., Du B., Tian H., et al. Plant sprout foods: biological activities, health benefits, and bioavailability. *Journal of Food Biochemistry*. 2022;46(3):13777. DOI: 10.1111/jfbc.13777.

11. Jiménez D., Lobo M., Irigaray B., Grompone M., Samman N. Oxidative stability of baby dehydrated purees formulated with different oils and germinated grain flours of quinoa and amaranth. *LWT*. 2020;127:109229. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109229.

12. Shah A., Masoodi F.A., Gani A., ul Ashraf Z., Ashwar B.A. Effect of different pretreatments on antioxidant activity of oats grown in the Himalayan region. *Journal of Food Science and Technology*. 2022;59:3464-3473. DOI: 10.1007/s13197-021-05336-6.

13. Bae H.-G., Kim M.-J. Antioxidant and anti-obesity effects of in vitro digesta of germinated buckwheat. *Food Science and Biotechnology*. 2022;31:879-892. DOI: 10.1007/s10068-022-01086-z.

14. Bhinder S., Singh N., Kaur A. Impact of germination on nutraceutical, functional and gluten free muffin making properties of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Food Hydrocolloids*. 2022;124(A):107268. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.107268.

15. Aparicio-García N., Martínez-Villaluenga C., Frias J., Peñas E. Sprouted oat as a potential gluten-free ingredient with enhanced nutritional and bioactive properties. *Food Chemistry*. 2021;338:127972. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127972.

16. Hung P.V., Trinh L.N.D., Thuy N.T.X., Morita N. Changes in nutritional composition, enzyme activities and bioactive compounds of germinated buckwheat (*Fagopyrum esculantum* M.) under unchanged air and humidity conditions. *International Journal of Food Science and Technology*. 2021;56(7):3209-3217. DOI: 10.1111/ijfs.14883.

17. Thakur P., Kumar K., Ahmed N., Chauhan D., Ul Eain Hyder Rizvi Q., Jan S., et al. Effect of soaking and germination treatments on nutritional, anti-nutritional,

and bioactive properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.), quinoa (*Chenopodium quinoa* L.), and buckwheat (*Fagopyrum esculantum* L.). *Current Research in Food Science*. 2021;4:917-925. DOI: 10.1016/j.crfs.2021.11.019.

18. Kaur H., Gill B.S. Comparative evaluation of physicochemical, nutritional and molecular interactions of flours from different cereals as affected by germination duration. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2020;14:1147-1157. DOI: 10.1007/s11694-019-00364-5.

19. Budhwar S., Sethi K., Chakraborty M. Efficacy of germination and probiotic fermentation on underutilized cereal and millet grains. *Food Production, Processing and Nutrition*. 2020;2:12. DOI: 10.1186/s43014-020-00026-w.

20. Li C., Jeong D., Lee J.H., Chung H.-J. Influence of germination on physicochemical properties of flours from brown rice, oat, sorghum, and millet. *Food Science and Biotechnology*. 2020;29:1223-1231. DOI: 10.1007/s10068-020-00770-2.

21. Brijs K., Trogh I., Jones B., Delcour J.A. Proteolytic enzymes in germinating rye grains. *Cereal Chemistry*. 2002;79(3):423-428. DOI: 10.1094/CCHEM.2002.79.3.423.

22. Kaur H., Gill B.S. Changes in physicochemical, nutritional characteristics and ATR-FTIR molecular interactions of cereal grains during germination. *Journal of Food Science and Technology*. 2021;58:2313-2324. DOI: 10.1007/s13197-020-04742-6.

23. Brinch-Pedersen H., Borg S., Tauris B., Holm P.B. Molecular genetic approaches to increasing mineral availability and vitamin content of cereals. *Journal of Cereal Science*. 2007;46(3):308-326. DOI: 10.1016/j.jcs.2007.02.004.

24. Carvalho G.R., Polachini T.C., Augusto P.E.D., Telis-Romero J., Bon J. Physical properties of barley grains at hydration and drying conditions of malt production. *Journal of Food Process Engineering*. 2021;44(4):e13644. DOI: 10.1111/jfpe.13644.

25. Singh A., Bobade H., Sharma S., Singh B., Gupta A. Enhancement of digestibility of nutrients (*in vitro*), antioxidant potential and functional attributes of wheat flour through grain germination. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2021;76:118-124. DOI: 10.1007/s11130-021-00881-z.

26. Sharma S., Singh A., Singh B. Characterization of in vitro antioxidant activity, bioactive components, and nutrient digestibility in pigeon pea (*Cajanus cajan*) as influenced by germination time and temperature. *Journal of Food Biochemistry*. 2019;43(2):e12706. DOI: 10.1111/jfbc.12706.

27. Medrano J., Leija-Martínez P., González-Morales S., Juárez Maldonado A., Benavides-Mendoza A. Use of Iodine to biofortify and promote growth and stress tolerance in crops. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:1146. DOI: 10.3389/fpls.2016.01146.

28. Kim S.-K., Bhatnagar I. Physical, chemical, and biological properties of wonder kelp – *Laminaria*. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2011;64:85-96. DOI: 10.1016/B978-0-12-387669-0.00007-7.

29. Bokov D.O., Potanina O.G., Nikulin A.V., Shchukin V.M., Orlova V.A., Bagirova G.B., et al. Modern approaches to the analysis of kelp (*Laminaria* sp.) as pharmacopoeial herbal drugs and food products. *Pharmacognosy Journal*. 2020;12(4):929-937. DOI: 10.5530/pj.2020.12.132.

30. Rajauria G., Ravindran R., García-Vaquero M., Rai D.K., Sweeney T., O'Doherty J. Molecular characteristics and antioxidant activity of laminarin extracted

from the seaweed species *Laminaria hyperborea*, using hydrothermal-assisted extraction and a multi-step purification procedure. *Food Hydrocolloids*. 2021;112:106332. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.106332.

31. Jin Z., Fang Z., Pei Z., Wang H., Zhu J., Lee Y., et al. A low molecular weight brown algae *Laminaria japonica* glycan modulates gut microbiota and body weight in mice. *Food & Function*. 2021;12:12606-12620. DOI: 10.1039/d1fo03024h.

32. Amoriello T., Mellara F., Amoriello M., Ceccarelli D., Ciccoritti R. Powdered seaweeds as a valuable ingredient for functional breads. *European Food Research and Technology*. 2021;247:2431-2443. DOI: 10.1007/s00217-021-03804-z.

33. Snegireva A.V., Shchetinin M.P., Meleshkina L.E. Chickpea sprouting as a way to increase the garnish nutritional value. *AIP Conference Proceedings*. 2021;2419:030005. DOI: 10.1063/5.0068798.

34. Veselovsky V.A., Veselova T.V. The disruption of aquaporin function in cell membranes as a cause of changes in germinability of pea seeds after exposure to low doses of γ -radiation. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2007;47(1):28-33. (In Russian). EDN: HZLHKT.

35. Obroucheva N.V., Sinkevich I.A., Lityagina S.V., Novikova G.V. Water relations in germinating seeds. *Fiziologiya rastenii*. 2017;64(4):311-320. (In Russian). DOI: 10.7868/S0015330317030137. EDN: YTMHOX.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Снегирева Анна Владимировна,

к.т.н., доцент,
Алтайский государственный технический
университет им И.И. Ползунова,
650000, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
✉ sne.anna@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2461-1848>

Мелёшкина Лариса Егоровна,

к.т.н., доцент,
Алтайский государственный технический
университет им И.И. Ползунова,
650000, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
meleshkina_le@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0812-3630>

Мусина Ольга Николаевна,

д.т.н., доцент,
руководитель Сибирского научно-
исследовательского института сыроделия,
Федеральный Алтайский научный
центр агробιοтехнологий,
656910, г. Барнаул, Научный городок, 35,
Российская Федерация,
профессор,
Алтайский государственный технический
университет им И.И. Ползунова,
650000, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
musinaolga@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4938-8136>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anna V. Snegireva,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Polzunov Altai State Technical University,
46, Lenin Ave., Barnaul, 650000,
Russian Federation,
✉ sne.anna@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2461-1848>

Larisa E. Meleshkina,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Polzunov Altai State Technical University,
46, Lenin Ave., Barnaul, 650000,
Russian Federation,
meleshkina_le@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0812-3630>

Olga N. Musina,

Dr. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Head of the Siberian Research Institute
of Cheese-Making,
Federal Altai Scientific Centre
of Agro-BioTechnologies,
35, Nauchnyi gorodok, Barnaul, 656910,
Russian Federation,
Professor,
Polzunov Altai State Technical University,
46, Lenin Ave., Barnaul, 650000,
Russian Federation,
musinaolga@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4938-8136>

Вклад авторов

А.В. Снегирева – разработка общей концепции проекта, выполнение исследования, статистическая обработка данных, интерпретация результатов, написание текста статьи.

Л.Е. Мелешкина – разработка общей концепции проекта, развитие методологии, интерпретация результатов, написание текста статьи.

О.Н. Мусина – привлечение финансирования, разработка общей концепции проекта, развитие методологии, обсуждение и интерпретация результатов, написание и редактирование текста статьи.

Contribution of the authors

Anna V. Snegireva – research concept development, conducting experiments, statistics, data processing, results interpretation, writing the text of manuscript.

Larisa E. Meleshkina – research concept and methodology development, and methodology, results interpretation, writing the text of manuscript.

Olga N. Musina – research concept and methodology development, fund raising, result discussion and interpretation, writing and editing the text of manuscript.

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 13.11.2023.
Одобрена после рецензирования 19.06.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

Information about the article

The article was submitted 13.11.2023.
Approved after reviewing 19.06.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.

Научная статья
УДК 664.162.036.4:577.15
EDN: YXAMLK
DOI: 10.21285/achb.933



Ферментативный гидролиз высококонцентрированных субстратов, полученных из мискантуса гигантского

Е.А. Скиба*✉, Е.И. Кашеева*, В.Н. Золотухин*, А.А. Кухленко**

*Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, Бийск, Российская Федерация

**АО «Специальное конструкторско-технологическое бюро «Катализатор»»,
Новосибирск, Российская Федерация

Аннотация. В работе впервые исследуется ферментативный гидролиз четырех видов субстратов, полученных из мискантуса гигантского сорта КАМИС российской селекции, с помощью авторских методов химической предварительной обработки, проводимой при атмосферном давлении с использованием разбавленных растворов HNO_3 и NaOH . Одностадийная предварительная обработка мискантуса гигантского позволяет повысить содержание полисахаридов до 90,4–90,8%, а двустадийная обработка – до 98,3–99,4%. Результаты опытных данных ферментативного гидролиза четырех полученных субстратов в диапазоне начальных концентраций от 30 до 120 г/л аппроксимированы с использованием подходов фрактальной кинетики. Повышение начальных концентраций субстрата в указанном диапазоне приводит к повышению начальной скорости гидролиза в 2,8–3,3 раза и снижению выхода редуцирующих сахаров на 12,4–13,1%. Все четыре вида предобработки оказались чрезвычайно эффективны для мискантуса гигантского, так как обеспечили повышение реакционной способности к ферментативному гидролизу в 34–36 раз по сравнению с исходным сырьем. Сниженные выходы редуцирующих сахаров наблюдаются при ферментативном гидролизе продукта щелочной делигнификации мискантуса гигантского, что связано с устойчивостью мискантуса гигантского к обработке гидроксидом натрия. Повышение начальной концентрации субстратов от 60 до 90 г/л не приводит к существенному снижению выхода редуцирующих сахаров, поэтому ферментативный гидролиз высококонцентрированных субстратов может успешно использоваться для получения биотоплив и биохимикатов.

Ключевые слова: мискантус гигантский, ферментативный гидролиз, высокая концентрация, фрактальная кинетика.

Финансирование. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>.

Для цитирования: Скиба Е.А., Кашеева Е.И., Золотухин В.Н., Кухленко А.А. Ферментативный гидролиз высококонцентрированных субстратов, полученных из мискантуса гигантского // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 394–405. DOI: 10.21285/achb.933. EDN: YXAMLK.

Enzymatic hydrolysis of highly concentrated substrates obtained from *Miscanthus giganteus*

Ekaterina A. Skiba*✉, Ekaterina I. Kashcheyeva*,
Vladimir N. Zolotukhin*, Alexey A. Kukhlenko**

*Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies SB RAS, Biysk, Russian Federation

**Joint Stock Company "Special Design and Technology Bureau 'Catalyst'", Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. This work is the first to study the enzymatic hydrolysis of four types of substrates obtained from *Miscanthus giganteus* of the KAMIS variety of Russian breeding. The study was conducted using the authors' methodology based on a chemical pretreatment of substrates at atmospheric pressure with HNO_3 and NaOH dilute solutions. A one-stage pretreatment of *Miscanthus giganteus* allows the polysaccharide content to be increased up to 90.4–90.8%, compared to 98.3–99.4% following a two-stage treatment. The experimental results of enzymatic hydrolysis of the four obtained substrates in the range of initial concentrations from 30 to 120 g/l are approximated using fractal kinetics approaches. An increase in the initial substrate concentrations in the specified range leads to an increase in the initial hydrolysis rate by 2.8–3.3 times and a decrease in the yield of reducing sugars by 12.4–13.1%. All four pretreatment types turned out to be extremely effective for *Miscanthus giganteus*, ensuring an increase in the reactivity to enzymatic hydrolysis by 34–36 times compared to the starting raw material. Lowered yields of reducing sugars are observed during enzymatic hydrolysis of the alkaline delignification product of *Miscanthus giganteus*, which is associated with the resistance of *Miscanthus giganteus* to treatment with sodium hydroxide. An increase in the initial concentration of substrates from 60 to 90 g/l does not lead to a significant decrease in the yield of reducing sugars. Therefore, enzymatic hydrolysis of highly concentrated substrates can be successfully used to produce biofuels and biochemicals.

Keywords: miscanthus, pretreatment, enzymatic hydrolysis, high concentration, fractal kinetics

Funding. The Russian Science Foundation supported this research (no. 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>).

For citation: Skiba E.A., Kashcheyeva E.I., Zolotukhin V.N., Kukhlenko A.A. Enzymatic hydrolysis of highly concentrated substrates obtained from *Miscanthus giganteus*. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):394–405. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.933. EDN: YXAMLK.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с истощением невозобновляемых углеводородов перед мировым сообществом встала задача поиска возобновляемого сырья для его трансформации в широкий спектр продуктов химического и микробиологического синтеза. В настоящее время общепризнано, что именно целлюлозосодержащее сырье является базовым для развития экономики замкнутого цикла – это дает основания называть ее биоэкономикой замкнутого цикла (экономикой, построенной на биологических ресурсах) [1, 2].

В настоящее время целлюлозосодержащее сырье рассматривается намного шире, чем древесина и отходы ее переработки: это и пожнивные остатки, и биомасса энергетических растений, и целлюлозная фракция бытовых отходов [3–5]. Наиболее эффективным источником биомассы являются энергетические растения, а одним из самых значимых энергетических растений во всем мире признан мискантус [6–9]. Как показали обзоры [8, 9], основными отраслями использования мискантуса являются энергетика, строительство, целлюлозно-бумажная промышленность, химическая промышленность и биотехнологическое производство. Биотехнологическое производство неслучайно стоит в

этом списке на последнем месте – его эффективность является дискуссионным вопросом: в литературе есть иллюстрации как успешного применения мискантуса (например, для синтеза биоэтанола [6, 7]), так и не очень успешного его использования (например, для синтеза фумаровой кислоты [10]).

Известно, что в трансформации любого целлюлозосодержащего сырья в продукты биотехнологического синтеза ключевой стадией, определяющей эффективность всего процесса, является предварительная обработка [3]. Второй по значимости и тесно связанной с первой является стадия ферментативного гидролиза [11].

Факторов, влияющих на эффективность конверсии целлюлозосодержащего сырья в редуцирующие сахара (РС), очень много. Условно можно разбить их на две группы: влияние ферментов и влияние субстратов (их происхождения и способов получения). Эти две группы факторов тесно связаны и оказывают друг на друга взаимное влияние. Несогласованность действия ферментов приводит к неполному гидролизу целлюлозы и гемицеллюлоз, поэтому выход сахаров ниже теоретических значений [3].

При переходе на высококонцентрированные субстраты выход сахаров неизбежно будет уменьшаться,

поэтому повышение концентраций низкоферментативных субстратов бессмысленно. Выход сахаров уменьшается из-за повышения вязкости реакционной массы, что приводит к снижению эффективности биоконверсии целлюлозы, кроме того, при увеличении концентрации сахаров происходит ингибирование целлюлаз согласно принципу обратной связи [12]. Ко всему прочему, повышение вязкости реакционной массы приводит к снижению эффективности перемешивания и теплопередачи и, как следствие, к большему энергопотреблению [13, 14].

Тем не менее переход к высококонцентрированным концентрациям субстратов необходим для ряда биотехнологических производств, например, для получения биоэтанола. Осуществление процесса ферментативного гидролиза при повышенных концентрациях субстрата позволяет снизить себестоимость готовой продукции, так как обеспечивает повышение выхода целевого продукта. Повышение выхода достигается благодаря сокращению продолжительности процесса, уменьшению дозировки ферментов и снижению вероятности микробной контаминации.

Исследования поведения субстратов в процессе ферментативного гидролиза при их повышенных концентрациях имеют важное практическое значение для прогнозирования выходов целевых продуктов микробиологического синтеза (из растворов РС, полученных в процессе ферментативного гидролиза) и для экономической оценки потенциальных производств. В данной работе впервые исследуется зависимость эффективности ферментативного гидролиза от начальной концентрации четырех субстратов, полученных авторскими способами из мискантуса гигантского, выращенного в Российской Федерации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве сырья в работе использовали мискантус гигантский (*Miscanthus × giganteus*) сорта КАМИС российской селекции урожая 2022 г., который был предоставлен ООО «Мастер Брэнд», г. Москва. Четыре субстрата для ферментативного гидролиза были получены в лабораторных условиях обработкой сырья при атмосферном давлении и температуре 90–96 °С в одну или две стадии:

- 1) продукт азотнокислой обработки (ПАО) – получен обработкой сырья 4%-м раствором HNO_3 в одну стадию;
- 2) продукт щелочной делигнификации (ПЩД) – получен обработкой сырья раствором 4%-го NaOH в одну стадию;
- 3) техническая целлюлоза, азотнокислый способ (ЦАС) – получен в две стадии путем обработки ПАО раствором 4%-го NaOH ;
- 4) техническая целлюлоза, модифицированный щелочной способ (ЦМЩС) – получен в две стадии путем обработки ПЩД раствором 4%-й HNO_3 .

Полученные образцы высушивались на воздухе для анализа химического состава и дальнейшего ферментативного гидролиза. Массовая доля сухих веществ

образцов определялась на анализаторе влажности MB 23 (Ohaus, США). Анализ химического состава субстратов проводился по общепринятым для анализа растительного сырья «мокрым» методам. Массовая доля целлюлозы по Кюршнеру в образцах ПАО и ПЩД определялась путем экстракции смесью HNO_3 и спирта в соотношении 1:4 в течение 4 ч [15]. Массовая доля α -целлюлозы в образцах ЦАС и ЦМЩС оценивалась количественным определением нерастворившегося в 17,5%-м растворе гидроксида натрия остатка субстрата¹. Массовая доля остаточного лигнина оценивалась в соответствии с методикой TAPPI T 222 om-02². Массовая доля пентозанов определялась спектрофотометрическим способом на UNICO UV-2804 (United Products and Instruments, США) с использованием раствора орсиана¹. Зольность оценивалась путем сжигания образца при 600 °С в течение 3 ч³.

Ферментативный гидролиз проводился с помощью композиций из ферментных препаратов «Целлолюкс-А» («Сиббиофарм», Россия) и «Ультрафло Коре» (Novozymes A/S, Дания) в 0,05 М ацетатном буферном растворе (pH 4,7). Начальные концентрации субстратов составляли 30, 60, 90 и 120 г/л. Ферментные препараты добавлялись в избытке: «Целлолюкс-А» – 0,1 г/г субстрата, «Ультрафло Коре» – 0,3 мл/г субстрата. Объем ацетатного буфера – 150 мл, температурный режим – (46±2) °С, скорость перемешивания – 150 об/мин. Процесс гидролиза осуществлялся с использованием горизонтального перемешивающего устройства ЭКРОС ПЭ-6410 с нагревом («Экохим», Россия). Через определенные промежутки времени проводился отбор проб из гидролизатов для определения концентрации РС с помощью спектрофотометра Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США) при длине волны 530 нм с использованием реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты (Panreac, Испания) [16].

Обработка опытных данных включала расчет констант в кинетических закономерностях, полученных на базе математической модели фрактальной кинетики. Проверка воспроизводимости экспериментальных результатов осуществлялась по критерию Кохрена [17]. Каждая экспериментальная точка для всех образцов была получена при одинаковом числе параллельных измерений, которое было равно трем. В результате проверки установлено, что все опытные данные воспроизводимы, так как расчетные значения критерия Кохрена были меньше критических.

Проведенное исследование было выполнено с использованием приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, г. Бийск, Россия).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Химический состав мискантуса и субстратов из него приведен в табл. 1. Одностадийная предварительная обработка мискантуса гигантского позволяет повысить

¹ Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: учеб. пособие для студентов вузов. М.: Экология, 1991. 320 с.

² TAPPI T 222 om-02. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. Atlanta: TAPPI Press, 2002.

³ TAPPI T 211 om-85. Ash in wood, pulp, paper, and paperboard. Atlanta: TAPPI Press, 1985.

содержание гидролизующих веществ (целлюлозы и гемицеллюлоз) до 90,4–90,8%, то есть на 13,6–14,0% по сравнению с нативным мискантусом, а двустадийная обработка позволяет повысить содержание гидролизующих веществ до 98,3–99,4%, то есть на 7,5–9,0% по сравнению с одностадийной обработкой. При этом выход субстратов, полученных двустадийно, на 10,0–18,0% ниже, чем выход субстратов, полученных одностадийно. Явление значительного снижения выхода при понижении доли нецеллюлозных компонентов в продуктах переработки (субстратах) закономерно и хорошо описано для разных видов целлюлозосодержащего сырья⁴.

Кроме режимов предварительной обработки химический состав субстратов зависит от природы целлюлозосодержащего сырья. В данной работе нами были применены авторские способы химической предварительной обработки мискантуса гигантского, проводимые при атмосферном давлении с использованием разбавленных растворов HNO_3 и NaOH . Ранее эти подходы были исследованы нами на мискантуса сахароцветного, справочно-химические составы мискантуса сахароцветного и субстратов из него также приведены в табл. 1 [18]. Химические составы мискантусов гигантского и сахароцветного близки. Отличия состоят в большей массовой доле целлюлозы для мискантуса гигантского по сравнению с мискантусом сахароцветным (54% против 50%) и в меньшей зольности (1,7% против 5,6%). Эти отличия объясняют получение больших выходов субстратов из мискантуса гигантского по сравнению с мискантусом сахароцветным: для одностадийно полученных субстратов – на 9–12%, для двустадийно полученных субстратов – на 5,0–5,5%.

Химические составы субстратов из мискантуса гигантского и мискантуса сахароцветного, полученных идентичными методами, также близки. Тем не менее нами обнаружено принципиальное отличие в поведении мискантуса гигантского, а именно его устойчивость к щелочной делигнификации: при одностадийной обработке гидроксидом натрия содержание остаточного лигнина

в ПЩД мискантуса гигантского в 2,4 раза выше, чем в ПЩД мискантуса сахароцветного (9,0% против 3,8%). При этом в нативных мискантусах содержание лигнина находится на одном уровне около 21%.

Делигнификация с помощью NaOH – это классический промышленный метод предобработки травянистого целлюлозосодержащего сырья, но для древесного сырья он менее эффективен [19, 20]. На волокно лубяного сырья NaOH не оказывает воздействия, а костра лубяного сырья делигнифицируется весьма умеренно [21]. Основное воздействие щелочи на целлюлозосодержащее сырье заключается именно в делигнификации. Гидроксид натрия эффективно атакует связи между лигнином и гемицеллюлозами в лигнин-углеводных комплексах и расщепляет эфирные и сложноэфирные связи. Кроме того, NaOH эффективно расщепляет сложноэфирные и углерод-углеродные связи в молекулах лигнина. Эффективность щелочной делигнификации целлюлозосодержащего сырья зависит от его технологических режимов, а также от химического состава сырья и его морфологических особенностей [19].

Мискантус гигантский более устойчив к щелочной делигнификации, чем мискантус сахароцветный, благодаря своим морфологическим особенностям: это высокорослое, до 4 м высотой, растение с мощными стеблями толщиной до 2 см и крепкими междоузлиями. По прочности стебли мискантуса гигантского сравнимы с бамбуком, который, как и мискантус, относится к семейству злаковых. Мискантус сахароцветный может достигать высоты 3 м, но толщина стеблей составляет не более 0,8 см и после высушивания они напоминают стебли соломы.

Далее было исследовано поведение при ферментативном гидролизе четырех субстратов, полученных из мискантуса гигантского. В табл. 2 представлены средние значения экспериментальных данных по кинетике ферментативного гидролиза.

Известно, что кинетика ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья подчиняется классиче-

Таблица 1. Химический состав мискантуса и субстратов из него, %

Table 1. Chemical composition of miscanthus and substrates from it, %

Показатели	Сырье	Субстраты			
		ПАО	ПЩД	ЦАС	ЦМЩС
Мискантус гигантский (данная работа)					
Массовая доля целлюлозы	54,0±0,4	83,0±0,4	86,3±0,4	96,9±0,4	94,0±0,4
Массовая доля пентозанов	22,8±0,1	7,4±0,1	4,5±0,1	2,5±0,1	5,3±0,1
Массовая доля кислотонерастворимого лигнина	21,0±0,1	7,5±0,1	9,0±0,1	0,5±0,1	0,6±0,1
Массовая доля золы	1,7±0,01	2,1±0,01	0,19±0,01	0,12±0,01	0,06±0,01
Сумма гидролизующих веществ	76,8±0,3	90,4±0,3	90,8±0,3	99,4±0,3	98,3±0,3
Выход из 100 кг сырья	–	50±0,1	48±0,1	32±0,1	38±0,1
Мискантус сахароцветный [18]					
Массовая доля целлюлозы	50,3±0,4	79,2±0,4	86,5±0,4	95,8±0,4	92,6±0,4
Массовая доля пентозанов	22,7±0,1	7,0±0,1	9,4±0,1	2,5±0,1	6,4±0,1
Массовая доля кислотонерастворимого лигнина	21,4±0,1	9,6±0,1	3,8±0,1	1,5±0,1	0,6±0,1
Массовая доля золы	5,6±0,01	4,2±0,01	0,3±0,01	0,2±0,01	0,4±0,01
Сумма гидролизующих веществ	72,3±0,3	86,2±0,3	96,0±0,3	98,3±0,3	98,0±0,3
Выход из 100 кг сырья	–	37,7±0,1	39,0±0,1	24,6±0,1	33,4±0,1

⁴ Технология целлюлозно-бумажного производства: справ. материалы. В 3 т. Т. 1. Ч. 1. СПб.: Изд-во ЛТА, 2002. 420 с.

Таблица 2. Средние значения экспериментальных данных по кинетике ферментативного гидролиза (приведены концентрации редуцирующих сахаров, г/л)

Table 2. Average values of experimental data on the kinetics of enzymatic hydrolysis (the concentrations of reducing sugars are given, g/l)

Образец	Начальная концентрация субстрата, г/л	Продолжительность гидролиза, ч					
		8	24	32	48	56	72
ПАО	30	12,2±0,2	18,5±0,5	19,0±0,5	21,5±0,5	21,5±0,5	21,5±0,5
	60	19,8±0,5	33,0±0,5	33,5±0,5	36,8±0,5	39,0±0,5	39,5±0,5
	90	27,5±0,5	49,5±0,5	51,0±1,0	55,0±1,0	58,5±1,0	59,0±1,0
	120	37,5±0,5	55,0±1,0	58,5±1,0	67,5±1,0	68,5±1,0	68,5±1,0
ПДЩ	30	10,0±0,2	17,0±0,2	19,1±0,2	19,8±0,5	20,2±0,5	20,2±0,5
	60	18,3±0,2	31,0±0,5	34,0±0,5	35,2±0,5	37,0±0,5	37,3±0,5
	90	25,8±0,5	42,0±0,5	48,5±0,5	53,5±1,0	55,0±1,0	55,0±1,0
	120	33,8±0,5	53,0±1,0	57,3±0,5	63,4±1,0	64,2±1,0	64,0±1,0
ЦАС	30	12,8±0,2	17,5±0,2	18,5±0,2	20,0±0,5	21,0±0,5	21,0±0,5
	60	22,8±0,5	30,5±0,5	32,8±0,5	36,5±0,5	39,0±0,5	39,0±0,5
	90	32,0±0,5	48,2±0,5	50,0±0,5	53,0±1,0	57,5±1,0	57,5±1,0
	120	41,3±0,5	54,0±0,5	58,0±1,0	67,5±1,0	67,5±1,0	67,5±1,0
ЦМЩС	30	13,0±0,2	17,5±0,2	20,0±0,5	20,5±0,5	21,0±0,5	21,0±0,5
	60	23,0±0,5	31,0±0,5	36,2±0,5	38,0±0,5	38,5±0,5	38,5±0,5
	90	31,8±0,5	49,5±0,5	50,5±1,0	52,0±1,0	53,5±1,0	56,5±1,0
	120	40,0±0,5	60,5±1,0	65,0±1,0	66,0±1,0	66,5±1,0	66,5±1,0

скому уравнению Михаэлиса – Ментен [22, 23]. Это уравнение справедливо для идеальных условий, когда используются химически чистые вещества и перемешивание реагентов осуществляется в гомогенной среде. В реальных условиях твердая фаза субстрата имеет многокомпонентную по химическому составу фрактальную структуру. Это означает, что структуры субстратов обладают свойством самоподобия, когда объект в точности или приближенно совпадает с частью себя самого или, другими словами, целое имеет ту же форму, что и одна или более его частей. В высококонцентрированных средах затруднен массо- и теплообмен. В связи с этим для описания кинетики ферментативного гидролиза субстратов с такой фрактальной структурой использование классических уравнений реакций первого порядка приводит к расхождениям между экспериментальными и теоретическими результатами [24].

По данной причине для описания процесса ферментативного гидролиза наиболее пригодной является математическая модель, полученная на уравнениях реакций псевдопервого порядка [25, 26]. При построении подобной математической модели предполагается, что различные гидролитические ферменты оказывают единое влияние на расщепление нерастворимых субстратов [27, 28]. В таком случае кинетика ферментативного гидролиза для всех субстратов может быть описана уравнением псевдопервого порядка реакции, имеющим вид

$$C(t) = C_m[1 - \exp(-k \times t^a)], \quad (1)$$

где $C(t)$ – мгновенная концентрация РС, кг/м³; C_m – предельная (максимальная теоретическая) концентрация РС для конкретного субстрата, г/л; k – константа, характеризующая скорость процесса гидролиза, ч⁻¹; a – фрактальная константа, характеризующая степень реакции ферментативного гидролиза.

Выражение (1) использовалось при построении кинетических закономерностей для всех опытных образцов. При этом исходили из следующих предположений:

- изменение концентрации РС от продолжительности процесса при ферментативном гидролизе подчиняется экспоненциальному закону;
- используемые субстраты существенно отличаются по исходному химическому составу;
- равномерность распределения ферментативного препарата по объему субстрата не контролировалась, что может оказывать существенное влияние на кинетику процесса.

Для вычисления записанных в выражении (1) констант данные табл. 2 были линеаризованы. В результате этого исходное выражение (1) было приведено к виду

$$y = ax + b, \quad (2)$$

где $y = \ln \{ \ln [C/(C - C_m)] \}$; $a = a$; $x = \ln(t)$; $b = \ln(k)$.

Значение параметра C_m принималось равным величине максимальной возможной концентрации РС, которая определялась индивидуально для каждого субстрата.

В результате выполнения процедуры линеаризации исходных экспериментальных данных и их обратного преобразования были вычислены коэффициенты, входящие в выражение (1). Результаты расчета коэффициентов сведены в табл. 3, куда также были записаны значения коэффициентов детерминации R^2 для всех видов субстратов. Высокие значения R^2 (более 0,91), наблюдаемые во всех экспериментах, указывают на эффективность фрактальной кинетической модели при описании ферментативного гидролиза различных типов субстратов.

Все полученные зависимости, описывающие поведение кинетики ферментативного гидролиза по выражению (1), с учетом коэффициентов, записанных в табл. 3, подтвердили свою адекватность по критерию Фишера при уровне значимости 0,05.

Таблица 3. Значения констант математической модели для четырех субстратов

Table 3. Values of mathematical model constants for four substrates

Образец	Начальная концентрация субстрата, г/л	Константы			R^2	Начальная скорость, г/(л×ч)
		C_m , г/л	k , ч ⁻¹	a		
ПАО	30	21,9	0,140	0,82	0,95	2,86
	60	40,3	0,129	0,79	0,98	4,87
	90	60,1	0,092	0,87	0,95	5,27
	120	69,9	0,124	0,83	0,95	8,18
ПЩД	30	20,6	0,101	0,91	0,99	1,97
	60	38,0	0,118	0,83	0,98	4,23
	90	56,1	0,094	0,87	0,99	5,03
	120	65,4	0,113	0,87	0,99	7,01
ЦАС	30	21,4	0,201	0,69	0,96	3,89
	60	39,8	0,165	0,73	0,92	6,05
	90	59,7	0,163	0,74	0,95	8,83
	120	68,9	0,172	0,75	0,91	10,90
ЦМЩС	30	21,4	0,213	0,70	0,97	4,12
	60	39,3	0,179	0,74	0,96	6,43
	90	57,6	0,217	0,65	0,95	11,25
	120	67,8	0,224	0,71	0,98	13,62

Расчет скорости реакции ферментативного гидролиза в любой момент времени должен осуществляться с учетом предложенного уравнения (1) по выражению

$$\frac{dC(t)}{dt} = C_m \times k \times a \times t^{a-1} \times \exp(-kt^a). \quad (3)$$

В то же время вычисление начальной скорости реакции для всех образцов аналитическим способом невозможно. Это связано с тем, что при $t = 0$ для $a < 1$ выражение $dC/dt \rightarrow \infty$.

По этой причине расчет начальной скорости реакции ферментативного гидролиза осуществлялся по формуле

$$\frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{C_{\text{теор.}}(1) - C_{\text{теор.}}(0)}{1 - 0}, \quad (4)$$

где $C_{\text{теор.}}(1)$ – теоретически вычисленное по выражению (1) с использованием коэффициентов табл. 3 значение концентрации РС при $t = 1$ ч от начала процесса ферментативного гидролиза, г/л; $C_{\text{теор.}}(0) = 0$ – начальная концентрация РС в момент времени $t = 0$, г/л.

Данные по расчету начальной скорости процесса ферментативного гидролиза по формуле (4) также были внесены в табл. 3.

Константа, характеризующая скорость процесса гидролиза, k зависит и от вида предобработки, и от начальной концентрации субстрата. Для субстратов, полученных двустадийно (ЦАС и ЦМЩС), константа скорости гидролиза выше, чем для субстратов, полученных одностадийно (ПАО и ПЩД), в 1,6–1,8 раза: 0,163–0,224 ч⁻¹ против 0,092–0,140 ч⁻¹, что объясняется химической чистотой двустадийно полученных субстратов. Поведение субстратов, полученных с помощью кислоты или щелочи на первой стадии, принципиально отличается при повышении начальной концентрации субстрата. Так, субстраты, полученные с использованием HNO₃ на первой стадии предобработки (ПАО и ЦАС), при повышении начальной концентрации субстрата демонстрируют небольшое снижение константы k : на 11,4% ПАО и на 14,4% ЦАС, в то время как субстраты, полученные с

использованием NaOH на первой стадии предобработки (ПЩД и ЦМЩС), напротив, при повышении начальной концентрации субстрата демонстрируют небольшое повышение константы k : на 11,9% ПЩД и на 5,2% ЦМЩС.

Как было показано в работе [29], константа скорости k в основном связана с реакционной способностью предварительно обработанного субстрата образовывать комплекс с целлюлазами. Постепенное снижение константы скорости k при увеличении начальной концентрации субстрата связано с рядом явлений, таких как ингибирование и дезактивация ферментов, затрудненность массопереноса из-за повышенного содержания твердого вещества [14]. Щелочная делигнификация приводит к образованию очень рыхлых субстратов [3], поэтому в указанном диапазоне начальных концентраций не наблюдается снижения k для субстратов ПЩД и ЦМЩС. В целом важно поддерживать баланс между высокой начальной концентрацией субстрата с целью увеличения концентрации РС в растворе и высокой скоростью ферментативного гидролиза с целью получения высоких выходов РС.

Фрактальная константа a отражает влияние предварительной обработки на структуру и доступность лигноцеллюлозы. Принято считать, что более низкие значения a характеризуют более доступные к действию ферментов субстраты, характеризующиеся, в свою очередь, аморфной структурой и быстрым массопереносом [30]. В целом коэффициент скорости k больше связан с доступностью целлюлозы в начальный момент ферментативного гидролиза, а фрактальный показатель a – с доступностью целлюлозы для воздействия ферментов в процессе ферментативного гидролиза [27].

В данной работе двустадийно предобработанные субстраты демонстрируют значения a ниже в 1,2 раза, чем одностадийно предобработанные субстраты (0,65–0,75 против 0,79–0,91). Это представляется обоснованным, так как при двустадийной обработке в субстратах меньше нецеллюлозных примесей и целлюлоза более доступна для взаимодействия с ферментами.

Увеличение начальных концентраций субстрата не оказывает существенного влияния на фрактальную константу a . Это связано с тем, что в течение первых двух часов ферментативного гидролиза происходит быстрое снижение кажущейся вязкости и предела текучести суспензии субстрата, суспензия разжижается и переходит в жидкое состояние [31]. Из-за быстрого разжижения фрактальная константа a , свидетельствующая о доступности целлюлозы при гидролизе, существенно не зависит от концентрации субстрата. Обе константы используют для оценки характеристик гидролиза различных видов предобработки биомассы. В работе [27] сравнение константы скорости k и фрактальной константы a при различных начальных концентрациях субстратов показало, что увеличение начальной концентрации субстрата значительно снижает доступность целлюлозы на начальной стадии гидролиза, не влияя при этом на доступность целлюлозы во время гидролиза. В нашем случае получены похожие закономерности.

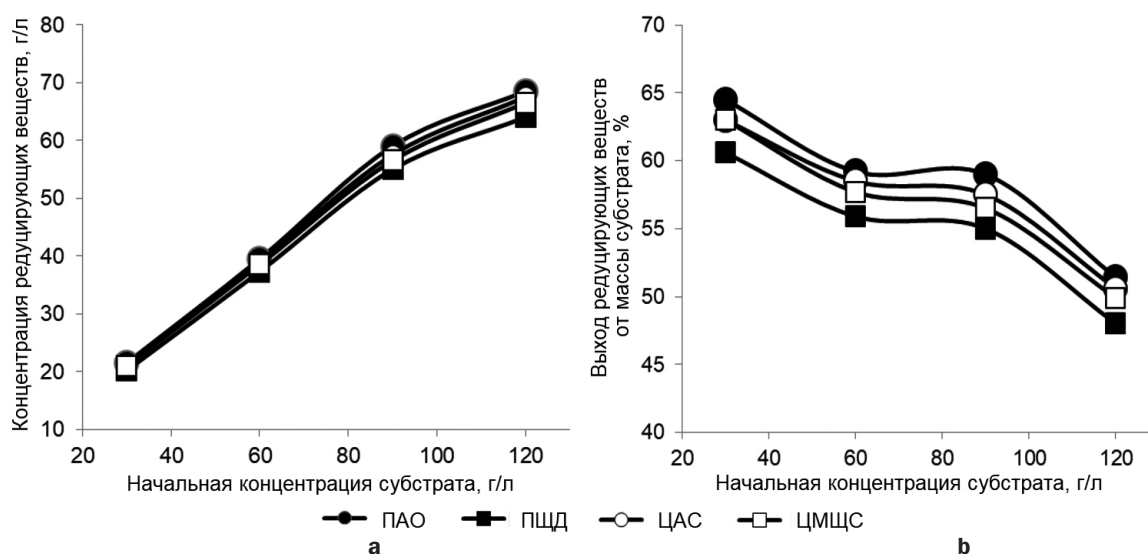
Наглядно особенности ферментативного гидролиза любых субстратов характеризует начальная скорость гидролиза (см. табл. 3). Двустадийно предобработанные субстраты демонстрируют более высокие скорости гидролиза, чем одностадийно предобработанные, и в исследуемом диапазоне начальных концентраций от 30 до 120 г/л изучаемые субстраты по начальной скорости гидролиза можно расположить в ряд: ЦМЩС > ЦАС > ПАО > ПЩД. Для всех субстратов характерно повышение начальной скорости гидролиза при повышении начальной концентрации субстрата: для ПАО в 2,9 раза, для ПЩД в 3,6 раза, для ЦАС в 2,8 раза, для ЦМЩС в 3,3 раза.

Главным критерием эффективности ферментативного гидролиза является не скорость гидролиза, а выход РС от массы субстрата [14, 22, 32]. Для всех субстратов при повышении начальной концентрации субстрата наблюдается повышение предельной концентрации C_m , что закономерно. Однако при увеличении C_m наблю-

дается снижение выхода РС. По выходу РС изучаемые субстраты можно расположить в следующий ряд: ПАО > ЦАС > ЦМЩС > ПЩД. Несколько сниженный выход РС для ПЩД (на 4–7% по сравнению с лидером) объясняется недостаточной делигнификацией мискантуса гигантского в выбранных условиях предобработки. Таким образом, для определения эффективности ферментативного гидролиза важно выполнить эксперимент до конца, не ограничиваясь анализом только начальной скорости гидролиза.

Нативный мискантус гигантский при концентрации субстрата 30 г/л обеспечивает концентрацию РС через 72 ч ферментативного гидролиза 0,6 г/л, что соответствует выходу РС 1,8%. Предобработка обеспечивает существенное повышение реакционной способности к ферментативному гидролизу в 34–36 раз (выход РС составляет 61% для ПЩД и 65% для ПАО). Это очень хороший результат, указывающий на высокую эффективность примененных предобработок. Согласно данным мировой литературы, предобработка считается эффективной, если она позволяет повысить реакционную способность к ферментативному гидролизу в 5–7 раз [3].

Снижение выхода РС при повышении начальной концентрации субстрата является неизбежным негативным эффектом. На рисунке показана зависимость концентрации и выхода РС по окончании ферментативного гидролиза от начальной концентрации субстратов, полученных из мискантуса гигантского. Для всех субстратов выход РС резко снижается от 62–65 до 58–59% при повышении начальной концентрации субстрата от 30 до 60 г/л. В диапазоне от 60 до 90 г/л выход РС стабильно сохраняется на уровне 56–59%, а при дальнейшем повышении начальной концентрации субстрата до 120 г/л резко падает до 49–52%. В целом при повышении начальной концентрации субстратов от 30 до 120 г/л выход РС уменьшается на 12,4–13,1%. Таким образом, диапазон от 60 до 90 г/л вполне приемлем для дальнейшей биотехнологической трансформации в биотоплива и биохимикаты.



Зависимость концентрации (а) и выхода (б) редуцирующих веществ по окончании ферментативного гидролиза от начальной концентрации субстратов

Dependence of concentration (a) and reducing substances yield (b) at the end of enzymatic hydrolysis on the initial concentration of substrates

Показательной является принципиальная разница при ферментативном гидролизе в поведении субстратов, полученных из мискантуса гигантского, в данной работе и в поведении субстратов, полученных из мискантуса сахароцветного, описанном нами ранее в работе [18]. Через 72 ч ферментативного гидролиза при начальной концентрации субстрата 30 г/л были получены следующие выходы РС в расчете на массу субстрата [18]: нативный мискантус сахароцветный – 11,1%; ПАО – 80,5%, ПЩД – 79,9%, ЦАС – 72,1%; ЦМЩС – 81,0%. Таким образом, снижение выхода РС для субстратов из мискантуса гигантского по сравнению с выходом РС для субстратов из мискантуса сахароцветного составило 11,1–15,5%. При этом реакционная способность к ферментативному гидролизу нативного мискантуса гигантского в 6,2 раза ниже, чем нативного мискантуса сахароцветного (выход РС 1,8% против 11,1% соответственно). В работах применены идентичные методы предобработки, разница состояла только в использовании разных видов сырья одного и того же биологического вида. Морфологические особенности сырья оказались определяющими для поведения субстратов при ферментативном гидролизе. Природа сырья такова, что мискантус гигантский более устойчив к физико-химическому и ферментативному воздействиям, чем мискантус сахароцветный. Устойчивость нельзя считать недостатком мискантуса гигантского, так как именно она определяет успешность его применения в целлюлозно-бумажной промышленности, строительстве, энергетике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из мискантуса гигантского сорта КАМИС российской селекции с применением авторских методов химической предобработки, реализуемых при атмосферном давлении с использованием разбавленных растворов HNO_3 и NaOH , получено четыре субстрата. Установлено, что одностадийная обработка мискантуса гигантского приводит к повышению содержания гидролизующихся

веществ в субстратах до 90,4–90,8%, что на 13,6–14,0% выше по сравнению с нативным мискантусом, а двустадийная обработка приводит к повышению содержания гидролизующихся веществ до 98,3–99,4%, что на 7,5–9,0% выше по сравнению с одностадийной обработкой. При этом выход субстратов, полученных двустадийно, на 10,0–18,0% ниже, чем субстратов, полученных одностадийно.

В результате исследования ферментативного гидролиза полученных субстратов и математической обработки опытных данных установлено, что для субстратов, полученных двустадийно, константа, характеризующая скорость процесса гидролиза, в 1,6–1,8 раза выше, а константа фрактальности в 1,2 раза ниже, чем для субстратов, полученных одностадийно. При повышении начальной концентрации субстрата от 30 до 120 г/л для всех субстратов наблюдается снижение выхода РС на 12,4–13,1% при повышении начальной скорости гидролиза в 2,8–3,3 раза.

Нативный мискантус характеризуется высокой устойчивостью к ферментативному гидролизу, выход РС от массы субстрата составляет всего 1,8%. Авторская предобработка привела к повышению реакционной способности субстратов к ферментативному гидролизу в 34–36 раз по сравнению с нативным сырьем, что является выдающимся результатом. Самые высокие выходы РС получены при одностадийной обработке мискантуса гигантского разбавленным раствором HNO_3 . Сниженные выходы РС наблюдаются при ферментативном гидролизе продукта щелочной делигнификации мискантуса гигантского, что связано с устойчивостью данного вида сырья к обработке гидроксидом натрия.

Ферментативный гидролиз высококонцентрированных субстратов может успешно использоваться для получения биотоплив и биохимикатов, так как повышение начальной концентрации субстратов до 90 г/л не приводит к существенному снижению выхода РС.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Wagh M.S., Sowjanya S., Nath P.C., Chakraborty A., Amrit R., Mishra B., et al. Valorisation of agro-industrial wastes: circular bioeconomy and biorefinery process – a sustainable symphony // *Process Safety and Environmental Protection*. 2024. Vol. 183. P. 708–725. DOI: 10.1016/j.psep.2024.01.055.
2. Mohammad R.E.A., Abdullahi S.S.A., Muhammed H.A., Musa H., Habibu S., Jagaba A.H., et al. Recent technical and non-technical biorefinery development barriers and potential solutions for a sustainable environment: a mini-review // *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*. 2024. Vol. 9. P. 100586. DOI: 10.1016/j.csee.2023.100586.
3. Zabel H., Sahu J.N., Boyce A.N., Faruq G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches // *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2016. Vol. 66. P. 751–774. DOI: 10.1016/j.rser.2016.08.038.
4. Ha D.T., Kanarsky A.V., Kanarskaya Z.A., Shcherbakov A.V., Shcherbakova E.N., Pranovich A.V. Impact of cultivation conditions on xylanase production and growth in *Paenibacillus mucilaginosus* // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. № 3. С. 459–469. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-459-469. EDN: OMLQLP.
5. Хоанг К.К., Евстафьев С.Н. Оптимизация процесса обработки ультразвуком соломы пшеницы в среде хлорида 1-бутил-3-метилимидазолия // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2017. Т. 7. № 2. С. 105–112. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-2-105-112. EDN: YTPLTV.
6. Boakye-Boaten N.A., Kurkalova L., Xiu S., Shahbazi A. Techno-economic analysis for the biochemical conversion of *Miscanthus x giganteus* into bioethanol // *Biomass and Bioenergy*. 2017. Vol. 98. P. 85–94. DOI: 10.1016/j.biombioe.2017.01.017.
7. Zhang Y., Oates L.G., Serate J., Xie D., Pohlmann E., Bukhman Y.V., et al. Diverse lignocellulosic feedstocks can achieve high field-scale ethanol yields while providing flexibility for the biorefinery and landscape-level environmental benefits // *Global Change Biology Bioenergy*. 2018. Vol. 10, no. 11. P. 825–840. DOI: 10.1111/gcbb.12533.
8. Shavyrkina N.A., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Sakovich G.V. Review of Current Prospects for Using *Miscanthus*-Based Polymers // *Polymers*. 2023. Vol. 15, no. 14. P. 3097. DOI: 10.3390/polym15143097.
9. Mironova G.F., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Kashcheyeva E.I., Sakovich G.V. Recent advances in *Miscanthus* macromolecule conversion: a brief overview //

International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24, no. 16. P. 13001. DOI: 10.3390/ijms241613001.

10. Sebastian J., Rouissi T., Brar S.K. *Miscanthus* sp. – perennial lignocellulosic biomass as feedstock for greener fumaric acid bioproduction // *Industrial Crops and Products*. 2022. Vol. 175. P. 114248. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.114248.

11. Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review // *Bioresource Technology*. 2010. Vol. 101, no. 13. P. 4851–4861. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.093.

12. Agrawal R., Satlewal A., Gaur R., Mathur A., Kumar R., Gupta R.P., et al. Pilot scale pretreatment of wheat straw and comparative evaluation of commercial enzyme preparations for biomass saccharification and fermentation // *Biochemical Engineering Journal*. 2015. Vol. 102. P. 54–61. DOI: 10.1016/j.bej.2015.02.018.

13. Kadhum H.J., Mahapatra D.M., Murthy G.S. A comparative account of glucose yields and bioethanol production from separate and simultaneous saccharification and fermentation processes at high solids loading with variable PEG concentration // *Bioresource Technology*. 2019. Vol. 283. P. 67–75. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.060.

14. Sun C., Meng X., Sun F., Zhang J., Tu M., Chang J.-S., et al. Advances and perspectives on mass transfer and enzymatic hydrolysis in the enzyme-mediated lignocellulosic biorefinery: a review // *Biotechnology Advances*. 2023. Vol. 62. P. 108059. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.108059.

15. Kurschner K., Hoffer A. Cellulose and cellulose derivative // *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1993. Vol. 92, no. 3. P. 145–154.

16. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // *Analytical Chemistry*. 1959. Vol. 31, no. 3. P. 426–428. DOI: 10.1021/ac60147a030.

17. Cochran W.G. The comparison of percentages in matched samples // *Biometrika*. 1950. Vol. 37, no. 3-4. P. 256–266. DOI: 10.1093/biomet/37.3-4.256.

18. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Pretreatments of non-woody cellulosic feedstocks for bacterial cellulose synthesis // *Polymers*. 2019. Vol. 11, no. 10. P. 1645. DOI: 10.3390/polym11101645.

19. Kim J.S., Lee Y.Y., Kim T.H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass // *Bioresource Technology*. 2016. Vol. 199. P. 42–48. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.085.

20. Chaudhary G., Chaudhary N., Saini S., Gupta Y., Vivekanand V., Panghal A. Assessment of pretreatment strategies for valorization of lignocellulosic biomass: path forwarding towards lignocellulosic biorefinery // *Waste and Biomass Valorization*. 2024. Vol. 15, no. 1. P. 1–36. DOI: 10.1007/s12649-023-02219-z.

21. Корчагина А.А., Гладышева Е.К., Будаева В.В., Скиба Е.А. Химический состав волокна и костры лубяных культур и продуктов их щелочной делигнификации // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*.

2023. Т. 13. N 4. С. 621–630. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-621-630. EDN: KSVUTY.

22. Baksi S., Sarkar U., Villa R., Basu D., Sengupta D. Conversion of biomass to biofuels through sugar platform: a review of enzymatic hydrolysis highlighting the trade-off between product and substrate inhibitions // *Sustainable Energy Technologies and Assessments*. 2023. Vol. 55. P. 102963. DOI: 10.1016/j.seta.2022.102963.

23. Harun R., Danquah M.K. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production // *Chemical Engineering Journal*. 2011. Vol. 168, no. 3. P. 1079–1084. DOI: 10.1016/j.cej.2011.01.088.

24. Pahari S., Kim J., Choi H.-K., Zhang M., Ji A., Yoo C.G., et al. Multiscale kinetic modeling of biomass fractionation in an experiment: understanding individual reaction mechanisms and cellulose degradation // *Chemical Engineering Journal*. 2023. Vol. 467. P. 143021. DOI: 10.1016/j.cej.2023.143021.

25. Xu F., Ding H. A new kinetic model for heterogeneous (or spatially confined) enzymatic catalysis: contributions from the fractal and jamming (overcrowding) effects // *Applied Catalysis A: General*. 2007. Vol. 317, no. 1. P. 70–81. DOI: 10.1016/j.apcata.2006.10.014.

26. Wojtusik M., Zurita M., Villar J.C., Ladero M., Garcia-Ochoa F. Enzymatic saccharification of acid pretreated corn stover: empirical and fractal kinetic modelling // *Bioresource Technology*. 2016. Vol. 220. P. 110–116. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.08.069.

27. Li H., Zhai R., Chen X., Jiang X., Li C., Deng Q., et al. Modeling and design of fed-batch strategies for achieving 255 g/L sugar concentration from high-solid enzymatic hydrolysis of pretreated corn stover // *Chemical Engineering Journal*. 2024. Vol. 486. P. 150268. DOI: 10.1016/j.cej.2024.150268.

28. Fockink D.H., Urio M.B., Sánchez J.H., Ramos L.P. Enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse: effect of enzyme loading and substrate total solids on its fractal kinetic modeling and rheological properties // *Energy & Fuels*. 2017. Vol. 31, no. 6. P. 6211–6220. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.7b00818.

29. Bansal P., Hall M., Realff M.J., Lee J.H., Bommaris A.S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates // *Biotechnology Advances*. 2009. Vol. 27, no. 6. P. 833–848. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.06.005.

30. Wang Z., Feng H. Fractal kinetic analysis of the enzymatic saccharification of cellulose under different conditions // *Bioresource Technology*. 2010. Vol. 101, no. 20. P. 7995–8000. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.05.056.

31. Lu M., Li J., Han L., Xiao W. High-solids enzymatic hydrolysis of ballmilled corn Stover with reduced slurry viscosity and improved sugar yields // *Biotechnology for Biofuels*. 2020. Vol. 13, no. 1. P. 77. DOI: 10.1186/s13068-020-01717-9.

32. Sinitsyn A.P., Sinitsyna O.A. Bioconversion of renewable plant biomass. Second-generation biofuels: raw materials, biomass pretreatment, enzymes, processes, and cost analysis // *Biochemistry (Moscow)*. 2021. Vol. 86. P. S166–S195. DOI: 10.1134/S0006297921140121.

REFERENCES

1. Wagh M.S., Sowjanya S., Nath P.C., Chakraborty A., Amrit R., Mishra B., et al. Valorisation of agro-industrial wastes: circular bioeconomy and biorefinery process – a sustainable symphony. *Process Safety and Environmental Protection*. 2024;183:708-725. DOI: 10.1016/j.psep.2024.01.055.

2. Mohammad R.E.A., Abdullahi S.S.A., Muhammed H.A., Musa H., Habibu S., Jagaba A.H., et al. Recent technical and non-technical biorefinery development barriers and potential solutions for a sustainable environment: a mini-review. *Case Studies in Chemical and Environmental*

Engineering. 2024;9:100586. DOI: 10.1016/j.cscee.2023.100586.

3. Zabed H., Sahu J.N., Boyce A.N., Faruq G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2016;66:751-774. DOI: 10.1016/j.rser.2016.08.038.

4. Ha D.T., Kanarsky A.V., Kanarskaya Z.A., Shcherbakov A.V., Shcherbakova E.N., Pranovich A.V. Impact of cultivation conditions on xylanase production and growth in *Paenibacillus mucilaginosus*. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):459-469. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-459-469. EDN: OMLQLP.

5. Hoang Q.C., Evstaf'ev S.N. Optimization of wheat straw ultrasound processing in the environment of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017;7(2):105-112. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-2-105-112. EDN: YTPLTV.

6. Boakye-Boaten N.A., Kurkalova L., Xiu S., Shahbazi A. Techno-economic analysis for the biochemical conversion of *Miscanthus x giganteus* into bioethanol. *Biomass and Bioenergy*. 2017;98:85-94. DOI: 10.1016/j.biombioe.2017.01.017.

7. Zhang Y., Oates L.G., Serate J., Xie D., Pohlmann E., Bukhman Y.V., et al. Diverse lignocellulosic feedstocks can achieve high field-scale ethanol yields while providing flexibility for the biorefinery and landscape-level environmental benefits. *Global Change Biology Bioenergy*. 2018;10(11):825-840. DOI: 10.1111/gcbb.12533.

8. Shavyrkina N.A.; Budaeva V.V.; Skiba E.A.; Gismatulina Y.A.; Sakovich G.V. Review of Current Prospects for Using *Miscanthus*-Based Polymers. *Polymers*. 2023;15(14):3097. DOI: 10.3390/polym15143097.

9. Mironova G.F., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Kashcheyeva E.I., Sakovich G.V. Recent advances in *Miscanthus* macromolecule conversion: a brief overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(16):13001. DOI: 10.3390/ijms241613001.

10. Sebastian J., Rouissi T., Brar S.K. *Miscanthus* sp. – perennial lignocellulosic biomass as feedstock for greener fumaric acid bioproduction. *Industrial Crops and Products*. 2022;175:114248. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.114248.

11. Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*. 2010;101(13):4851-4861. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.093.

12. Agrawal R., Satlewal A., Gaur R., Mathur A., Kumar R., Gupta R.P., et al. Pilot scale pretreatment of wheat straw and comparative evaluation of commercial enzyme preparations for biomass saccharification and fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2015;102:54-61. DOI: 10.1016/j.bej.2015.02.018.

13. Kadhum H.J., Mahapatra D.M., Murthy G.S. A comparative account of glucose yields and bioethanol production from separate and simultaneous saccharification and fermentation processes at high solids loading with variable PEG concentration. *Bioresource Technology*. 2019;283:67-75. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.060.

14. Sun C., Meng X., Sun F., Zhang J., Tu M., Chang J.-S., et al. Advances and perspectives on mass transfer and enzymatic hydrolysis in the enzyme-mediated

lignocellulosic biorefinery: a review. *Biotechnology Advances*. 2023;62:108059. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.108059.

15. Kurschner K., Hoffer A. Cellulose and cellulose derivative. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1993;92(3):145-154.

16. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426-428. DOI: 10.1021/ac60147a030.

17. Cochran W.G. The comparison of percentages in matched samples. *Biometrika*. 1950;37(3-4):256-266. DOI: 10.1093/biomet/37.3-4.256.

18. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Pretreatments of non-woody cellulosic feedstocks for bacterial cellulose synthesis. *Polymers*. 2019;11(10):1645. DOI: 10.3390/polym11101645.

19. Kim J.S., Lee Y.Y., Kim T.H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2016;199:42-48. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.085.

20. Chaudhary G., Chaudhary N., Saini S., Gupta Y., Vivekanand V., Panghal A. Assessment of pretreatment strategies for valorization of lignocellulosic biomass: path forwarding towards lignocellulosic biorefinery. *Waste and Biomass Valorization*. 2024;15(1):1-36. DOI: 10.1007/s12649-023-02219-z.

21. Korchagina A.A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Skiba E.A. Chemical composition of fiber and shive in bast-fiber crops and the products of their alkaline delignification. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):621-630. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-621-630. EDN: KSVUTY.

22. Baksi S., Sarkar U., Villa R., Basu D., Sengupta D. Conversion of biomass to biofuels through sugar platform: a review of enzymatic hydrolysis highlighting the trade-off between product and substrate inhibitions. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*. 2023;55:102963. DOI: 10.1016/j.seta.2022.102963.

23. Harun R., Danquah M.K. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*. 2011;168(3):1079-1084. DOI: 10.1016/j.cej.2011.01.088.

24. Pahari S., Kim J., Choi H.-K., Zhang M., Ji A., Yoo C.G., et al. Multiscale kinetic modeling of biomass fractionation in an experiment: understanding individual reaction mechanisms and cellulose degradation. *Chemical Engineering Journal*. 2023;467:143021. DOI: 10.1016/j.cej.2023.143021.

25. Xu F., Ding H. A new kinetic model for heterogeneous (or spatially confined) enzymatic catalysis: contributions from the fractal and jamming (overcrowding) effects. *Applied Catalysis A: General*. 2007;317(1):70-81. DOI: 10.1016/j.apcata.2006.10.014.

26. Wojtusik M., Zurita M., Villar J.C., Ladero M., Garcia-Ochoa F. Enzymatic saccharification of acid pretreated corn stover: empirical and fractal kinetic modelling. *Bioresource Technology*. 2016;220:110-116. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.08.069.

27. Li H., Zhai R., Chen X., Jiang X., Li C., Deng Q., et al. Modeling and design of fed-batch strategies for achieving 255 g/L sugar concentration from high-solid enzymatic hydrolysis of pretreated corn stover. *Chemical Engineering Journal*. 2024; 486:150268. DOI: 10.1016/j.cej.2024.150268.

28. Fockink D.H., Urio M.B., Sánchez J.H., Ramos L.P. Enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse: effect of enzyme loading and substrate total solids on its fractal kinetic modeling and rheological properties. *Energy & Fuels*. 2017;31(6):6211-6220. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.7b00818.

29. Bansal P., Hall M., Realff M.J., Lee J.H., Bommaris A.S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances*. 2009;27(6):833-848. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.06.005.

30. Wang Z., Feng H. Fractal kinetic analysis of the enzymatic saccharification of cellulose under different

conditions. *Bioresource Technology*. 2010;101(20):7995-8000. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.05.056.

31. Lu M., Li J., Han L., Xiao W. High-solids enzymatic hydrolysis of ballmilled corn Stover with reduced slurry viscosity and improved sugar yields. *Biotechnology for Biofuels*. 2020;13(1):77. DOI: 10.1186/s13068-020-01717-9.

32. Sinitsyn A.P., Sinitsyna O.A. Bioconversion of renewable plant biomass. Second-generation biofuels: raw materials, biomass pretreatment, enzymes, processes, and cost analysis. *Biochemistry (Moscow)*. 2021;86:S166-S195. DOI: 10.1134/S0006297921140121.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Скиба Екатерина Анатольевна,

д.т.н., доцент, ведущий научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
✉ eas08988@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8897-347X>

Кашеева Екатерина Ивановна,

к.т.н., старший научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
massl@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1593-7982>

Золотухин Владимир Николаевич,

к.т.н., старший научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
zolotukhin_vn@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9630-6332>

Кухленко Алексей Анатольевич,

к.т.н., ведущий инженер,
АО «Специальное конструкторско-
технологическое бюро "Катализатор"»,
630058, г. Новосибирск, ул. Тихая, 1,
Российская Федерация,
ak-79@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3088-1198>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ekaterina A. Skiba,

Dr. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Leading Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
✉ eas08988@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8897-347X>

Ekaterina I. Kashcheyeva,

Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
massl@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1593-7982>

Vladimir N. Zolotukhin,

Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 659322,
Russian Federation,
zolotukhin_vn@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9630-6332>

Alexey A. Kukhlenko,

Cand. Sci. (Engineering), Lead Engineer,
Joint Stock Company "Special Design and Technology
Bureau 'Catalyst'",
1, Tikhaya St., Novosibirsk, 630058,
Russian Federation,
ak-79@rambler.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3088-1198>

Вклад авторов

Е.А. Скиба – формальный анализ, обсуждение результатов, написание текста статьи.
Е.И. Кашеева – разработка концепции исследования, методология экспериментов, проведение экспериментов, обсуждение результатов.
В.Н. Золотухин – проведение экспериментов, обсуждение результатов.
А.А. Кухленко – обработка полученных данных, обсуждение результатов, редактирование текста статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 25.06.2024.
Одобрена после рецензирования 29.08.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

Contribution of the authors

Ekaterina A. Skiba – formal analysis, results discussion, writing the text of manuscript.
Ekaterina I. Kashcheyeva – research concept development, methodology of experiments, experimentation, result discussion.
Vladimir N. Zolotukhin – experimentation, result discussion.
Alexey A. Kukhlenko – data processing, result discussion, text editing.

Conflict interests

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

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

Information about the article

The article was submitted 25.06.2024.
Approved after reviewing 29.08.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.



Биохимический состав биосубстанций из пантов марала

И.Н. Гришаева✉, М.Г. Кротова

Федеральный Алтайский научный центр агробιοтехнологий, Барнаул, Российская Федерация

Аннотация. Целью настоящей работы являлось изучение биологически активных веществ в биосубстанциях, полученных из разных частей пантов марала. Замороженные рога марала разделяли на кожу и основу панта, измельчали и проводили ультразвуковой ферментативный гидролиз. Оставшийся жмых от экстракции основы панта марала сушили в вакуумной установке. В полученных биосубстанциях исследовали содержание белка, жира, золы и влаги, изучали аминокислотный, жирнокислотный и минеральный составы, а также молекулярно-массовое распределение пептидных фракций. По результатам проведенной работы установлено, что в концентратах из кожи и основы панта марала содержится максимальное содержание протеина (73,68–74,41%), а в минеральной биосубстанции – максимальное содержание макро- и микроэлементов (84,17%), в частности высокий уровень фосфора – 136000 мг/кг, натрия – 29230 мг/кг и кальция – 5140 мг/кг. Все биосубстанции характеризуются низким содержанием жира от 0,3 до 1,76%. Аналогично содержанию белка общая сумма аминокислот преобладает в концентратах из кожи и основы панта марала и составляет 40,90 и 43,66 г/100 г соответственно, причем в обоих образцах количество незаменимых аминокислот выше заменимых. Количество витаминов находится на низком уровне и представлено водорастворимыми витаминами В₁, В₂, В₆. Жирнокислотный состав наиболее сбалансирован в концентрате из основы панта марала, имеет в составе омега-3 и омега-6. Соотношение ненасыщенных жирных кислот к насыщенным равно 0,96. Изучение молекулярно-массового распределения пептидных фракций показало, что максимальное содержание пептидов с низкой молекулярной массой менее 2,9 кДа и до 6,4 кДа выявлено в концентрате из кожи панта – 54,7%.

Ключевые слова: марал, панты, биосубстанции, аминокислоты, пептиды, жирные кислоты, витамины

Финансирование. Научно-исследовательская работа выполнена на средства гранта губернатора Алтайского края для разработки качественно новых технологий, создания инновационных продуктов и услуг в сферах переработки и производства пищевых продуктов, фармацевтического производства и биотехнологий по теме «Разработка нового функционального продукта на основе безотходной биотехнологии переработки сырых пантов маралов в сочетании с лекарственными травами Алтайского края».

Для цитирования: Гришаева И.Н., Кротова М.Г. Биохимический состав биосубстанций из пантов марала // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 406–415. DOI: 10.21285/achb.931. EDN: APSYDX.

PHYSICO-CHEMICAL BIOLOGY

Original article

Biochemical composition of biological substances extracted from red deer antlers

Irina N. Grishaeva✉, Maria G. Krotova

Federal Altai Scientific Center of Agrobiotechnologies, Barnaul, Russian Federation

Abstract. We aim to study biologically active agents in biological substances obtained from different parts of red deer antlers. Frozen red deer antlers were separated into skin and antler base, crushed, and subjected to ultrasonic enzymatic hydrolysis. The press cake from the extraction of antler base was dried in a vacuum unit. The content of protein, fat, ash, and moisture in the obtained biological substances was studied. In addition, the amino

acid, fatty acid, and mineral compositions were analyzed, as well as the molecular weight distribution of peptide fractions. The concentrates from the skin and base of red deer antlers were found to contain the maximum of proteins (73.68–74.41%). The mineral biological substances comprise the maximum of macro- and microelements (84.17%), in particular, a high level of 136,000 mg/kg of phosphorus, 29,230 mg/kg of sodium, and 5,140 mg/kg of calcium. All biological substances are characterized by a low-fat content in the range from 0.3 to 1.76%. Similar to the protein content, the total amount of amino acids prevails in concentrates from the skin and base of red deer antlers, equaling 40.90 and 43.66 g/100 g, respectively. Moreover, in both samples, the amount of essential amino acids is higher than that of non-essential ones. The amount of vitamins is low, being represented by B₁, B₂, B₆ water-soluble vitamins. The fatty acid composition is most balanced in the concentrate from the red deer antler base, containing omega-3 and omega-6. The ratio of unsaturated to saturated fatty acids is equal to 0.96. In the concentrate from antler skin, the maximum content (54.7%) of peptides with a low molecular weight of less than 2.9 kDa and up to 6.4 kDa was found using the molecular-weight distribution of peptide fractions.

Keywords: red deer, antlers, biological substances, amino acids, peptides, fatty acids, vitamins

Funding. The Governor of the Altai Territory funded this work for the development of qualitatively new technologies, creation of innovative products and services in the areas of processing and production of food products, pharmaceutical production and biotechnology (topic “Development of a new functional product based on waste-free biotechnology for processing raw maral antlers in combination with medicinal herbs of the Altai Territory”).

For citation: Grishaeva I.N., Krotova M.G. Biochemical composition of biological substances extracted from red deer antlers. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):406-415. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.931. EDN: APSYDX.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы во всем мире отмечается особое внимание общественности к проблемам питания населения. Это объясняется осознанием специалистами многочисленных негативных последствий нарушения структуры питания и пищевого статуса человека, что влечет за собой потерю его здоровья и трудоспособности [1]. Концепция оптимального питания предусматривает необходимость полного обеспечения потребностей организма в энергии, макро- и микронутриентах и в целом ряде необходимых минорных биологически активных компонентов пищи. В связи с этим одним из важных направлений в пищевой промышленности является использование в составе продуктов питания натуральных ингредиентов, содержащих жизненно важные биологически активные вещества, полученных путем переработки нетрадиционного сырья.

Производство пантового оленеводства является проверенным источником сырья для производства биологически активных добавок и продуктов функционального питания [2]. Ее эффективность доказана многолетними научными исследованиями и опытом китайской народной медицины [3].

Исследования подтвердили, что из пантов успешно выделяют около 100 видов химических компонентов, причем пропорции этих веществ могут варьировать в зависимости от вида оленей. Доказано, что основными биологически активными ингредиентами пантов благородного оленя являются водорастворимые вещества, в основном содержащие белки, полипептиды, аминокислоты, полисахариды, факторы роста и т.д. [4]. Входящие в состав пантов аминокислоты, а также тестостерон, эстрадиол и инсулиноподобный фактор роста могут заменить дефицит эстрогена, что является важным фактором в борьбе с остеопорозом с потерей костной массы и снижением веса [5]. Хотя механизм действия пантов до сих пор не ясен, их фармакологическая активность может быть в большой степени отнесена к основным биологически активным соединениям аминокислот, полипептидов и белков.

Как показано в исследованиях на животных и клинических испытаниях, панты не имеют явных побочных эффектов. Тем не менее необходимы дальнейшие исследования для изучения отдельных биологически активных соединений, ответственных за эти фармакологические эффекты, и механизмов их действия.

Анализ научных публикаций и патентный поиск показал, что существует ряд работ отечественных и зарубежных исследователей, посвященных разработке продуктов питания, обогащенных продукцией пантового оленеводства. На основе пантогематогена сибирскими исследователями разработана биологически активная добавка с отличными потребительскими свойствами. Представлены результаты серии экспериментов по изготовлению на основе соков плодово-ягодных культур и сырья пантовых оленей продуктов функционального питания. Доказано влияние биологически активных веществ пантов марала на снижение токсичности спиртных напитков [6]. Разработан напиток функционального назначения на основе минеральной воды с добавлением сока брусники и экстрактов пантов северного оленя. С использованием пантогематогена также предложены рецептуры и технологии сахаристых кондитерских изделий и других биологически активных добавок. Представлены данные по технологии получения карамели, обогащенной пантами. Описано использование препарата пантов и комплексной дрожжевой подкормки в пивоварении [7]. Экстракты пантов и пантовая мука используются при производстве биологически активных добавок. Возможность использования пантового сырья доказана и для технологии хлебобулочных изделий [8].

Основными способами переработки продукции мараловодства на перерабатывающих предприятиях являются: измельчение (до порошкообразного состояния), спиртовая и водная экстракция консервированных пантов. В результате измельчения пантов производители вынуждены удалять и утилизировать кожу, теряя при этом до 25,0% массы пантов. Отечественными переработчиками широко используется водная и спиртовая экстракция продукции маралов, но и это позволяет

извлечь из сырья не более 10,0% сухих веществ, оставшийся жмых, как правило, утилизируется. При этом необходимо отметить, что измельченное сырье (панты) является нерастворимыми биосубстанциями. Это, в свою очередь, ограничивает область их использования, в то время как их получение связано с большими трудо- и энергозатратами.

Разработанные ранее сотрудниками Всероссийского научно-исследовательского института пантового оленеводства способы получения растворимых биосубстанций с использованием ферментов растительного (папаин) и животного (пепсин) происхождения ограничивались выходом не более 40,0% сухих веществ, что отражалось на стоимости конечного продукта [9]. Применение современных микробиологических ферментов позволило увеличить выход биологически активных компонентов до 55–60% – именно такое количество составляет органическую часть панта [10]. Основным принципом технологии является разделение тканей панта на составляющие с получением трех видов биосубстанций: концентрат из кожи панта, концентрат из основы панта, минеральная биосубстанция. Однако для дальнейшего использования полученных биосубстанций из пантов марала в составе пищевых продуктов необходимо детальное исследование их биохимического состава.

Целью настоящей работы являлось изучение биологически активных веществ в биосубстанциях, полученных из разных частей пантов марала.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В экспериментах использовали свежесрезанные панты марала, полученные с маральника «ОС «Новоталицкое» Федерального Алтайского научного центра агrobiотехнологий (Алтайский край).

Эксперименты проводили в лаборатории переработки и сертификации пантовой продукции отдела «Всероссийский научно-исследовательский институт пантового оленеводства» Федерального Алтайского научного центра агrobiотехнологий. Сырье разделяли на кожу и основу панта, измельчали по отдельности и направляли на ультразвуковой ферментативный гидролиз. Минеральный жмых, оставшийся в результате обработки основы панта, гидролизаты из кожи и основы панта сушили с применением вакуумной установки с последующим измельчением.

Для осуществления гидролиза кожи и основы панта проводили ферментализацию в поле ультразвука при интенсивности ультразвуковых колебаний 37 Вт с применением ферментов Протозим, Протозим С, Протозим Н («Биопрепарат», Россия) при температуре до 50 °С, pH 7,0 в течение 360 мин с последующим высокотемпературным гидролизом жмыха с водой при гидромодуле 1:6 в автоклаве при температуре 125 °С, давлении 0,25 МПа. Выбор комплекса ферментов основан

на ранее проведенных исследованиях, которые показали высокую специфичность по отношению к белковым компонентам пантов марала, термоустойчивость и доступность приобретения.

Химический состав биосубстанций из пантов марала, в частности массовой доли белка, определяли по ГОСТ 25011-2017¹, массовой доли влаги – по ГОСТ 15113.4-2021², массовой доли жира – по ГОСТ 15113.9-77³, массовой доли золы – по ГОСТ 15113.8-77⁴.

Аминокислотный состав биосубстанций определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на оборудовании Shimadzu LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония). Навески образцов гидролизировали 6 моль/л HCl в течение 18 ч при температуре 110±1 °С с дальнейшим преобразованием аминокислот в производные фенилизотиоцианата (PITC), идентификацию проводили диодно-матричным детектированием (SPD-20A) с длиной волны 254 нм.

Жирнокислотный состав определяли с помощью газожидкостного хромато-масс-спектрометра (Hewlett-Packard, США) по методике, изложенной в ГОСТ 31663-2012⁵.

Атомно-абсорбционный спектрофотометр Shimadzu AA-7000 (Shimadzu, Япония) использовался для оценки содержания калия, натрия, кальция, магния, фосфора, железа, марганца, меди, цинка, хрома, йода, селена.

Проведено исследование жирорастворимых и водорастворимых витаминов в биосубстанциях пантов. Определение проводили в соответствии с руководством Р 4.1.1672-03⁶. Для идентификации жирорастворимых витаминов применяли метод, основанный на щелочном гидролизе пробы биосубстанций и экстракции жирорастворимых витаминов диэтиловым эфиром, с упариванием полученного экстракта и переводом сухого остатка в растворитель для введения в ВЭЖХ колонку для хроматографического разделения и детектирования. Для водорастворимых витаминов применяли гидролиз с последующим разведением сухого остатка в воде и детектированием методом ВЭЖХ.

Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций в составе биосубстанций из пантов марала определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на аппарате Phenomenex (Yarra ZuSEC-2000).

Статистическую обработку полученных данных проводили методом вариационной статистики с применением пакета прикладных программ Microsoft Office 2010.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе научно-исследовательской работы проведен анализ химического состава различных биосубстанций из пантов марала. Полученные результаты представлены в табл. 1.

¹ ГОСТ 25011-2017. Мясо и мясные продукты. Методы определения белка. М.: Стандартинформ, 2018. 16 с.

² ГОСТ 15113.4-2021. Концентраты пищевые. Гравиметрические методы определения массовой доли влаги. М.: Российский институт стандартизации, 2021. 15 с.

³ ГОСТ 15113.9-77. Концентраты пищевые. Методы определения жира. М., 1977. 9 с.

⁴ ГОСТ 15113.8-77. Концентраты пищевые. Методы определения золы. М., 1977. 3 с.

⁵ ГОСТ 31663-2012. Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров жирных кислот. М.: Стандартинформ, 2013. 11 с.

⁶ Р 4.1.1672-03. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. М.: Минздрав России, 2004.

Каждая из биосубстанций на основе пантов марала характеризовалась определенным соотношением протеина, жира и золы. Из данных табл. 1 следует, что два вида пантовых биосубстанций содержат больше всего протеина (73,68–74,41%) – это биосубстанции из кожи и основы панта марала. Третья минеральная биосубстанция характеризовалась значительным количеством минеральных компонентов (84,17%), что опосредовано наличием костной ткани в составе панта. При фракционировании сырых пантов 78,8% зольных компонентов переходит в состав костно-минеральной субстанции, причем минеральные вещества в пантах представлены в виде гидроксипатитов [11], которые хорошо усваиваются в организме человека. Минимальное количество зольных компонентов (5,72%) отмечено в концентрате из кожи панта.

Массовая доля жира во всех биосубстанциях находится на низком уровне, максимальная концентрация 1,76% установлена в концентрате из кожи панта марала, тогда как в других фракциях установлено ее минимальное количество – от 0,30 до 0,60%.

На следующем этапе исследования проведено изучение аминокислотного состава в зависимости от вида биосубстанции. Полученные данные представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, в концентрате из основы панта общая сумма аминокислот была максимальной и составила 43,66 г/100 г, из них 25,85 г/100 г составляли заменимые аминокислоты и 17,81 г/100 г – незаменимые. В концентрате из кожи панта сумма аминокислот была на 6,3% ниже по сравнению с концентратом из основы панта и составила 40,90 г/100 г.

В составе биосубстанций из пантов марала обнаружены такие заменимые аминокислоты, как аспарагиновая кислота, аланин, глутаминовая кислота, пролин, глицин, серин, тирозин, цистин.

Во всех представленных биосубстанциях преобладающими являлись следующие аминокислоты: глицин, уровень которого составлял от 1,84 до 6,88 г/100 г в зависимости от вида биосубстанции, пролин с концентрацией от 1,10 до 6,05 г/100 г, глутаминовая кислота с концентрацией от 0,41 до 3,27 г/100 г и серин в количестве от 1,59 до 4,29 г/100 г.

Таблица 1. Химический состав биосубстанций из пантов марала

Table 1. Chemical composition of biosubstances from maral velvet antlers

Биосубстанции	Содержание, %			
	сухих веществ	протеина	минеральных веществ	жира
Концентрат из кожи панта	92,45±0,40	74,41±0,37	5,72±0,06	1,76±0,02
Концентрат из основы панта	96,07±0,42	73,68±0,41	8,78±0,08	0,60±0,01
Минеральная биосубстанция	92,23±0,51	8,53±0,05	84,17±0,95	0,30±0,01

Таблица 2. Аминокислотный состав биосубстанций из пантов марала

Table 2. Amino acid composition of biosubstances from maral velvet antlers

Показатель, г / 100 г	Концентрат из кожи панта	Концентрат из основы панта	Минеральная биосубстанция
Аспарагиновая кислота	1,31±0,002	1,29±0,001	0,54±0,001
Аланин	3,08±0,003	3,26±0,002	0,90±0,003
Глутаминовая кислота	3,27±0,001	3,17±0,005	0,41±0,002
Пролин	6,05±0,002	5,30±0,003	1,10±0,003
Глицин	6,88±0,003	5,93±0,004	1,84±0,003
Серин	2,07±0,001	4,29±0,003	1,59±0,002
Цистин	0,47±0,001	0,46±0,001	0,10±0,001
Тирозин	3,90±0,003	2,15±0,002	0,58±0,002
Сумма заменимых аминокислот	27,03	25,85	7,06
Метионин	0,69±0,002	0,81±0,003	0,41±0,002
Фенилаланин	1,66±0,003	2,22±0,002	0,41±0,001
Лизин	0,52±0,002	0,68±0,001	0,16±0,002
Треонин	2,19±0,004	2,21±0,004	0,18±0,001
Триптофан	1,31±0,002	1,17±0,002	0,36±0,001
Валин	1,15±0,003	1,88±0,003	0,31±0,001
Лейцин	1,78±0,001	2,52±0,001	0,67±0,001
Изолейцин	2,61±0,003	3,52±0,004	0,60±0,002
Аргинин	0,77±0,002	0,65±0,002	0,31±0,003
Гистидин	1,19±0,001	2,15±0,003	0,45±0,001
Сумма незаменимых аминокислот	13,87	17,81	3,86
Общая сумма аминокислот	40,90	43,66	10,92

Перечисленные аминокислоты имеют важное значение для организма человека: например, пролин (пирролидин- α -карбоновая кислота) способствует заживлению ран, укрепляет сухожилия, связки и суставы, увеличивает физическую работоспособность, укрепляет сердечную мышцу; глутаминовая кислота играет активную роль в обмене белка и в удалении из организма продуктов распада и является единственной аминокислотой, поддерживающей дыхание клеток головного мозга, поэтому глутаминовую аминокислоту и стволые клетки применяют при лечении некоторых нервных и психических заболеваний [12]; серин, в свою очередь, является предшественником таких физиологически важных веществ, как этаноламин, триптофан, холин, играет важную роль в проявлении каталитической активности многих расщепляющих белки ферментов [13].

Среди незаменимых аминокислот в составе биосубстанций из пантов марала выявлены такие аминокислоты, как метионин, фенилаланин, лизин, треонин, валин, триптофан, лейцин, изолейцин, а также аргинин и гистидин (условно незаменимые аминокислоты). Превалирующими среди незаменимых аминокислот являлись изолейцин, присутствующий в количестве от 0,60 до 3,52 г/100 г, и фенилаланин, содержащийся в количестве от 0,41 до 2,22 г/100 г. Фенилаланин регулирует функцию щитовидной железы и надпочечников. Из него образуется гормон тироксин, а также аминокислота тирозин, из которой, в свою очередь, образуется адреналин.

Лизин является одной из наиболее важных незаменимых аминокислот ввиду высокой потребности организма и незначительного ее содержания в широко распространенных продуктах. Недостаток лизина в питании приводит к уменьшению числа эритроцитов и снижению гемоглобина, возникновению дистрофических изменений в мышцах, в печени и в легких, нарушению кальцификации костей.

В концентрате из пантов аминокислота лизин присутствовала в количестве 0,68 г/100 г, а в минеральной субстанции в следовых количествах – 0,16 г/100 г.

Определен коэффициент отношения суммы незаменимых аминокислот к заменимым, который составил для концентрата из кожи панта 0,51, для концентрата из основы панта 0,68, для минеральной биосубстанции 0,54.

Таким образом, согласно данным аминокислотного

состава, наиболее полноценным является концентрат из основы панта марала.

Проведено исследование минерального состава биосубстанций из пантов марала. Полученные данные представлены в табл. 3.

Судя по результатам табл. 3, минеральная субстанция состояла в основном из фосфора, концентрация которого составила 136000 мг/кг, что в 17 раз больше, чем в концентрате из основы панта, и в 25,6 раза больше, чем в концентрате из кожи панта. Отмечено доминирование минеральной биосубстанции и по содержанию кальция, так его уровень составил 5140 мг/кг. В концентрате из кожи панта содержалось 1923 мг/кг, что в 2,7 раза меньше в сравнении с минеральной субстанцией. Минимальное количество кальция отмечено в концентрате из основы панта, его значение составило 572,5 мг/кг. Такое значительное количество кальция в минеральной биосубстанции панта обусловлено технологическим процессом извлечения органических веществ в концентрат из основы панта, соответственно, минеральная биосубстанция представлена костью-хрящевой тканью.

Кроме того, минеральная биосубстанция отличалась высоким содержанием натрия. Уровень натрия был в 9 раз выше, чем в концентрате из кожи панта, и в 358,2 раза выше, чем в концентрате из основы панта.

Из числа микроэлементов в наибольшем количестве содержалось железо, при этом максимальный его уровень 1485 мг/кг отмечен в минеральной биосубстанции, остальные биосубстанции в своем составе содержали железо в следовых количествах.

Таким образом, по составу макро- и микроэлементов наиболее полноценной является минеральная биосубстанция, которая при определенном соотношении способна обеспечить организм кальцием, фосфором, магнием и железом. Костно-минеральную субстанцию можно рекомендовать в качестве источника фосфора.

На следующем этапе исследований проведено изучение витаминного состава биосубстанций из пантов марала. Полученные данные представлены в табл. 4.

Как видно из табл. 4, определение витаминов в биосубстанциях в основном не показало каких-либо значимых результатов. В концентратах из кожи и основы панта марала обнаружены витамины В₁, В₂, В₆. При этом содержание В₁, В₆ было выше в субстанции из

Таблица 3. Минеральный состав биосубстанций из пантов марала

Table 3. Mineral composition of biosubstances from maral velvet antlers

Показатель, мг/кг	Концентрат из кожи панта	Концентрат из основы панта	Минеральная биосубстанция
Калий	779,1 $\pm$ 7,71	5,26 $\pm$ 0,52	12,1 $\pm$ 0,32
Натрий	3281,0 $\pm$ 12,62	81,6 $\pm$ 2 $\pm$ 3,24	29230,0 $\pm$ 32,6
Кальций	1923,0 $\pm$ 10,35	572,5 $\pm$ 9,21	5140,0 $\pm$ 10,3
Магний	636,5 $\pm$ 5,73	45,54 $\pm$ 2,12	1673,0 $\pm$ 3,25
Железо	24,91 $\pm$ 1,10	1,01 $\pm$ 0,003	1485,0 $\pm$ 3,04
Марганец	1,08 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,001	2,28 $\pm$ 0,02
Медь	246,2 $\pm$ 2,13	<0,01	202,3 $\pm$ 2,34
Цинк	15,32 $\pm$ 1,12	<0,01	27,65 $\pm$ 1,37
Хром	1,11 $\pm$ 0,01	<0,01	14,03 $\pm$ 2,41
Йод	0,54 $\pm$ 0,002	0,51 $\pm$ 0,002	0,13 $\pm$ 0,001
Селен	0,19 $\pm$ 0,001	0,26 $\pm$ 0,001	0,07 $\pm$ 0,001
Фосфор	5300,0 $\pm$ 22,63	7650,0 $\pm$ 20,36	136000,0 $\pm$ 25,63

Таблица 4. Витаминный состав биосубстанций из пантов марала

Table 4. Vitamin composition of biosubstances from maral velvet antlers

Витамины	Концентрат из кожи панта	Концентрат из основы панта
B ₁ , мг / 100 г	0,015	0,038
B ₂ , мг / 100 г	0,075	0,082
B ₆ , мг / 100 г	0,022	0,105
A, мг/кг	–	–
E, мг/кг	–	–
Никотиновая кислота, мг/кг	–	–

основы и кожи панта в 2,5–4,7 раза соответственно. В минеральных субстанциях витамины были вне зоны определения ГОСТ 15113.8-77⁴.

На следующем этапе исследования проведено изучение жирнокислотного состава биосубстанций из пантов марала. Полученные данные представлены в табл. 5.

Известно, что в качестве показателя функционального назначения пищевых продуктов жир пищи выполняет две функции: неспецифическую как источник энергии и специфическую как источник эссенциальных жирных кислот, жирорастворимых витаминов, материал для биосинтеза и построения жировых тканей организма [14]. Соотношение жирных кислот является одним из показателей биологической

Таблица 5. Жирнокислотный состав биосубстанций из пантов марала

Table 5. Fatty acid composition of biosubstances from maral velvet antlers

Наименование жирной кислоты	Индекс жирной кислоты	Концентрат из кожи панта	Концентрат из основы панта
Капроновая	6:0	–	0,09
Каприловая	8:0	–	0,05
Каприновая	10:0	–	0,04
Лауриновая	12:0	0,41	0,09
Миристиновая	14:0	2,16	1,85
Изо-пентадекановая	15:0i	0,25	0,34
Антеизо-пентадекановая	15:0ai	2,07	1,15
Пентадекановая	15:0	1,79	1,23
Пентадеценовая	15:1	0,67	0,53
Пальмитиновая	16:0	19,81	24,67
Гексадеценовая	16:1	1,08	1,07
Пальмитолеиновая	16:1 9-цис	2,35	1,94
Маргариновая	17:0	1,40	0,78
Гептадеценовая	17:1	1,09	0,40
Стеариновая	18:0	13,69	17,83
Элаидиновая	18:1 9-транс	1,16	1,51
Олеиновая	18:1 9-цис	17,93	19,17
Вакценовая	18:1 11-транс	3,58	3,74
Октадеценовая	18:1 11-цис	–	0,23
Изо-октадекадиеновая		1,76	1,17
Транс, цис-линолевая	18:2 9-транс, 12-цис	0,72	0,36
Линолевая	18:2	9,14	7,59
γ-линоленовая	18:3 ω-6	0,25	0,11
α-линоленовая	18:3 ω-3	0,81	0,48
Арахидиновая	20:0	0,93	0,65
Гондоиновая	20:1	4,49	2,42
Эйкозодиеновая	20:2	–	0,34
Эйкозатриеновая n6	20:3 8,11,14-цис	0,71	0,44
Арахидоновая	20:4 n6	4,84	5,59
Эйкозапентаеновая	20:5	0,87	0,50
Бегеновая	22:0	0,77	0,60
Эруковая	22:1	1,07	0,49
Докозодиеновая	22:2	–	–
Докозатетраеновая	22:4	1,09	0,08
Докозапентаеновая	22:5	2,44	1,73
Докозагексаеновая	22:6	0,22	0,14
Лигноцериновая	24:0	0,32	0,29
Нервоновая	24:1	0,10	0,29
Массовая доля насыщенных жиров		56,21	49,59
Массовая доля ненасыщенных жирных кислот		6,74	47,55
Массовая доля полиненасыщенных жирных кислот		15,32	17,00
Массовая доля омега-3		32,49	3,29
Массовая доля омега-6		56,21	13,71
Массовая доля мононенасыщенных жирных кислот		6,74	30,55

и, соответственно, пищевой ценности жиров, а полиненасыщенные жирные кислоты служат индикатором липидного обмена. Наличие жирных кислот в пантовых продуктах обеспечивает в числе прочего иммуномодулирующий эффект [15].

Установлена достаточно высокая биологическая ценность жирнокислотного состава пантов марала (см. табл. 5). В биосубстанциях идентифицировано 38 жирных кислот. Наличие в составе жира пантов эссенциальных жирных кислот – линолевой и линоленовой – свидетельствует о биологической эффективности липидов.

Важнейшим показателем нутриентной адекватности как сырья, так и готовой продукции является жирнокислотная сбалансированность их липидной фракции.

В зависимости от вида биосубстанции отмечены различия в соотношении насыщенных жиров к ненасыщенным. Так, в концентрате из основы панта насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты находились практически в равном соотношении, при этом среди ненасыщенных жиров преобладали мононенасыщенные жирные кислоты, составляя 30,55% от массы жиров соответственно. Коэффициент соотношения ненасыщенных жирных кислот к насыщенным составил 0,96. По этому показателю концентрат из основы панта наиболее приближен к «идеальному липиду» (в «идеальном липиде» данный коэффициент составляет от 0,6 до 0,9) [16].

В концентрате из кожи панта доля ненасыщенных жирных кислот составила 6,74%, из них на полиненасыщенные приходилось 15,32, на мононенасыщенные – 6,74%. В преобладающем количестве отмечены жирные кислоты омега-6. Массовая доля насыщенных жиров в биосубстанции из крови и лимфы составила 56,21%. Коэффициент отношения ненасыщенных жирных кислот к насыщенным равнялся 0,12. В минеральной субстанции жирные кислоты отсутствовали.

Таким образом, по результатам оценки жирнокислотного состава биосубстанций из пантов марала можно заключить, что при схожем качественном составе жирных кислот субстанции значительно отличались по процентному соотношению насыщенных и ненасыщенных жиров. При этом концентрат из основы панта по соотношению компонентов был ближе к оптимальному.

На следующем этапе исследования проведено определение молекулярно-массового распределения пептидных фракций в составе биосубстанций из пантов марала.

Согласно мнению ряда авторов, пептиды обладают большей потенциальной ценностью и биологической активностью по сравнению с высокомолекулярными белками, могут влиять на комплекс кишечных соединений, иммунные реакции слизистых оболочек, воспаление и/или микробиоту кишечника [17].

Биоактивные пептиды, полученные из пищевых продуктов, имеют широкое применение, например, в специальной диете для людей с фенилкетонурией, пищевой аллергией и хронической печеночной недостаточностью [18], спортивном питании, гериатрическом питании, функциональных продуктах питания и нутрицевтиках [19].

Согласно литературным данным, важной характеристикой пептидов является их молекулярная масса и аминокислотный состав. Было высказано предположение, что антиоксидантные свойства пептидов

связаны с их размером и аминокислотным составом. Указанные свойства подтверждены работой авторов [20]. Существует мнение, что наиболее мощную активность проявляют пептидные фракции с размером молекулы менее 3 кДа. Согласно данным литературы, биологически активные пептиды обычно состоят из менее чем 20 аминокислотных остатков. Соответственно, биологически активные пептиды в основном имеют молекулярную массу менее 10 кДа [17].

По утверждению О.В. Королевой, от степени гидролиза зависит область целевого использования белкового гидролизованного продукта [21].

Т. Бич-Ларсен указывает на целесообразность использования гидролизатов, содержащих 15–20% свободных аминокислот, ди-, три- и олигопептиды с молекулярной массой до 3000 Да, в спортивном питании и медицине (для энтерального зондового питания) [22]. По мнению Х. Коронен, при снижении молекулярного веса пептидов ниже 2500–3000 Да достигается гипоаллергенность продукта [23].

В ходе нашего исследования определены различия в молекулярно-массовом распределении пептидных фракций в зависимости от вида биосубстанции (табл. 6).

Как видно из табл. 6, в концентрате из основы панта марала отмечено минимальное количество высокомолекулярной фракции пептидов – более 232 кДа, составляющее 0,9%. Основное количество пептидов находилось в среднем диапазоне молекулярных масс 22,7–11,7 кДа, но при этом отмечено высокое процентное содержание низкомолекулярных легкоусвояемых пептидов с массой 6,4–2,9 кДа и менее 2,9 кДа – по 18,5%, соответственно.

Таблица 6. Молекулярно-массовое распределение пептидных фракций в составе биосубстанций из пантов марала

Table 6. Molecular-weight distribution of peptide fractions in the composition of biosubstances from maral velvet antlers

Наименование биосубстанции	Диапазон молекулярных масс, кД	Процент содержания фракции по оптической плотности при 280 нм
Концентрат из кожи панта	>232	9,0
	232–56,5	9,9
	56,5–22,5	7,8
	22,5–11,7	7,9
	11,7–6,4	10,6
	6,4–2,9	20,9
Концентрат из основы панта	<2,9	33,8
	>232	0,9
	232–56,5	6,7
	56,5–22,5	15,7
	22,5–11,7	27,5
	11,7–6,4	12,2
Минеральная биосубстанция	6,4–2,9	18,5
	<2,9	18,5
	>232	–
	232–56,5	–
	56,5–22,5	–
	22,5–11,7	–
	11,7–6,4	–
	6,4–2,9	–
	<2,9	–

Концентрат из кожи панта характеризовался содержанием пептидов низких молекулярных масс 6,4–2,9 и менее 2,9 кДа – на долю этих низкомолекулярных фракций приходится 54,7%. Минеральная субстанция не содержит пептидов.

Таким образом, согласно проведенному исследованию, степень гидролиза была выше в концентрате из кожи панта марала, о чем свидетельствует наличие большего количества пептидов низкой молекулярной массы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применяемые биотехнологические способы гидролиза пантового сырья позволили получить два вида биосубстанций – протеиновую и минеральную. Технология переработки кожи и основы панта эффективна по степени извлечения аминокислот и низкомо-

лекулярных пептидов и позволяет получить фракции с молекулярной массой в концентратах менее 6,5 кДа в количестве 54,7% от массы. Концентраты из кожи и основы панта характеризуются пептидами с аминокислотным составом, представленным незаменимыми и ценными заменимыми аминокислотами с высокой биологической активностью (аспарагиновая и глутаминовая кислоты, глицин, аланин, лизин, валин). Биосубстанции рекомендуются для дальнейшего применения в составе продуктов с обогащением по белку.

Минеральная биосубстанция представлена макро- и микроэлементами, максимальным по содержанию из которых является фосфор, ввиду чего данную биосубстанцию можно применять в качестве источника этого элемента при разработке рецептуры пищевых продуктов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Далисова Н.А., Рожкова А.В., Степанова Э.В. Экспорт продукции мараловодства и пантового оленеводства сибирских регионов // Социально-экономический и гуманитарный журнал Красноярского ГАУ. 2019. N 1. С. 35–45. EDN: YZSAMX.
2. Гришаева И.Н. Получение водного пантового экстракта // Научное обеспечение животноводства Сибири: материалы IV Междунар. науч.-практ. конф. (г. Красноярск, 14–15 мая 2020 г.). Красноярск: изд-во КрасНИИЖ, 2020. С. 486–489. EDN: PKVANH.
3. Белозерских И.С. Совершенствование метода производства биосубстанций из субпродуктов марала // Актуальные проблемы сельского хозяйства горных территорий: материалы VII Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию Горно-Алтайского государственного университета (г. Горно-Алтайск, 6–8 июня 2019 г.). Горно-Алтайск: Изд-во ГАГУ, 2019. С. 425–428. EDN: USFNIX.
4. Cao T., An H., Ma R., Dai K., Ji H., Liu A., et al. Structural characteristics of a low molecular weight velvet antler protein and the anti-tumor activity on S180 tumor-bearing mice // Bioorganic Chemistry. 2023. Vol. 131. P. 106304. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.106304.
5. Wang T., Luo E., Zhou Z., Yang J., Wang J., Zhong J., et al. Lyophilized powder of velvet antler blood improves osteoporosis in OVX-induced mouse model and regulates proliferation and differentiation of primary osteoblasts via Wnt/ β -catenin pathway // Journal of Functional Foods. 2023. Vol. 102. P. 105439. DOI: 10.1016/j.jff.2023.105439.
6. Li C. Deer antlers: traditional Chinese medicine use and recent pharmaceuticals // Animal Production Science. 2020. Vol. 60. P. 1233–1237. DOI: 10.1071/AN19168.
7. Пермьякова Л.В., Помозова В.А., Павлов А.А., Хорунжина С.И. Применение новых видов пищевых подкормок для дрожжей в производстве пива // Техника и технология пищевых производств. 2013. N 2. С. 46–52. EDN: QANQPI.
8. Шелепов В.Г., Кайзер А.А., Кашина Г.В. Биологически активная пищевая добавка из пантовой муки // Пищевая промышленность. 2008. N 8. С. 36–37.
9. Шабанов И.Е. Технология комплексной глубокой переработки сырья биологического происхождения на основе многостадийного фракционирования // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2012. N 2. С. 43–47. EDN: PIIQXJ.
10. Кротова М.Г., Луницын В.Г. Эффективность использования ферментов микробного происхождения при переработке сырья маралов // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2017. Т. 47. N 5. С. 97–103. DOI: 10.26898/0370-8799-2017-5-12. EDN: TLOWWE.
11. Nowicka W., Machoy Z., Gutowska I., Noceń I., Piotrowska S., Chlubek D. Contents of calcium, magnesium, and phosphorus in antlers and cranial bones of the European Red Deer (*Cervus Elaphus*) from different regions in Western Poland // Polish Journal of Environmental Studies. 2006. Vol. 15, no. 2. P. 297–301.
12. Rong X., Chu W., Zhang H., Wang Y., Qi X., Zhang G., et al. Antler stem cell-conditioned medium stimulates regenerative wound healing in rats // Stem Cell Research & Therapy. 2019. Vol. 10. P. 326. DOI: 10.1186/s13287-019-1457-9.
13. Owens S.L., Ahmed S.R., Lang Harman R.M., Stewart L.E., Mori S. Natural products that contain higher homologated amino acids // ChemBioChem. 2024. Vol. 25, no. 9. P. e202300822. DOI: 10.1002/cbic.202300822.
14. Субботина М.А. Физиологические аспекты использования жиров в питании // Техника и технология пищевых производств. 2009. N 4. С. 54–57. EDN: KYYQOV.
15. Yoo J., Lee J., Zhang M., Mun D., Kang M., Yun B., Yong-An K., et al. Enhanced γ -aminobutyric acid and sialic acid in fermented deer antler velvet and immune promoting effects // Journal of Animal Science and Technology. 2022. Vol. 64, no. 1. P. 166–182. DOI: 10.5187/jast.2021.e132.
16. Донскова Л.А., Беляев Н.М., Лейберова Н.В. Жирнокислотный состав липидов как показатель функционального назначения продуктов из мяса птицы: теоретические и практические аспекты // Индустрия питания. 2018. Т. 3. N 1. С. 4–10. DOI: 10.29141/2500-1922-2018-6-1-1. EDN: LBLIAX.
17. Bao X., Wu J. Impact of food-derived bioactive peptides on gut function and health // Food Research International. 2021. Vol. 147. P. 110485. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110485.
18. Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition // Trends in Food Science & Technology. 2000. Vol. 11, no. 7. P. 254–262. DOI: 10.1016/S0924-2244(01)00007-3.
19. Li-Chan E.C. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application

as nutraceuticals and functional food ingredients // *Current Opinion in Food Science*. 2015. Vol. 1. P. 28–37. DOI: 10.1016/j.cofs.2014.09.005.

20. Chen X., Xia P., Zheng S., Li Y., Fang J., Ma Z., et al. Antioxidant peptides from the collagen of antler ossified tissue and their protective effects against H₂O₂-induced oxidative damage toward HaCaT cells // *Molecules*. 2023. Vol. 28, no. 19. P. 6887. DOI: 10.3390/molecules28196887.

21. Королёва О.В., Агаркова Е.Ю., Ботина С.Г., Николаев И.В., Пономарёва Н.В., Мельникова Е.И. [и др.]. Перспективы использования гидролизатов сывороточных белков в технологии кисломолочных

продуктов // *Молочная промышленность*. 2013. N 7. С. 66–68. EDN: QJCRCX.

22. Beach-Larsen T., Scholderer J. Functional food in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects // *Trends in Food Science & Technology*. 2007. Vol. 18, no. 4. P. 231–234. DOI: 10.1016/j.tifs.2006.12.006.

23. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: production and functionality // *International Dairy Journal*. 2006. Vol. 16, no. 9. P. 945–960. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.10.012.

REFERENCES

1. Dalisova N.A., Rozhkova A.V., Stepanova E.V. The export of production of maraland deer punts breeding of Siberian regions. *The Social and economic and humanitarian magazine*. 2019;1:35-45. (In Russian). EDN: YZSAMX.

2. Grishaeva I.N. Obtaining an aqueous antler extract. In: *Nauchnoe obespechenie zhivotnovodstva Sibiri: materialy IV Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. = Scientific support of animal husbandry of Siberia: Proc. 4th Int. Sci. and Pract. Conf.* 14–15 May 2020, Krasnoyarsk. Krasnoyarsk: Krasnoyarsk Scientific-Research Institute of Animal Husbandry; 2020, p. 486-489. (In Russian). EDN: PKVAHR.

3. Belozerskikh I.S. Improvement of the method of manufacture of biosubstances from sub products of maral. In: *Aktual'nye problemy sel'skogo khozyaystva gornyykh territorii: materialy VII Mezhdunar. nauch.-prakt. konf., posvyashch. 70-letiyu Gorno-Altayskogo gosudarstvennogo universiteta = Actual problems of agriculture in mountainous territories: Proc. 7th Int. Sci. Pract. Conf. dedicated to the 70th anniversary of the Gorno-Altai State University*. 6–8 July 2019, Gorno-Altaysk. Gorno-Altaysk: Gorno-Altaysk State University; 2019, p. 425-428. (In Russian). EDN: USFNIX.

4. Cao T., An H., Ma R., Dai K., Ji H., Liu A., et al. Structural characteristics of a low molecular weight velvet antler protein and the anti-tumor activity on S180 tumor-bearing mice. *Bioorganic Chemistry*. 2023;131:106304. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.106304.

5. Wang T., Luo E., Zhou Z., Yang J., Wang J., Zhong J., et al. Lyophilized powder of velvet antler blood improves osteoporosis in OVX-induced mouse model and regulates proliferation and differentiation of primary osteoblasts via Wnt/ β -catenin pathway. *Journal of Functional Foods*. 2023;102:105439. DOI: 10.1016/j.jff.2023.105439.

6. Li C. Deer antlers: traditional Chinese medicine use and recent pharmaceuticals. *Animal Production Science*. 2020;60:1233-1237. DOI: 10.1071/AN19168.

7. Permyakova L.V., Pomozova V.A., Pavlov A.A., Khorounjina S.I. Application of new types of food supplements for yeast in beer production. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2013;2:46-52. (In Russian). EDN: QANQPJ.

8. Shelepov V.G., Kayzer A.A., Kashina G.V. Biologically active additive from pant flour. *Food processing Industry*. 2008;8:36-37. (In Russian).

9. Shabanov I.E. Technology complex deep processing of raw materials of biological origin on the basis of a multistage fractionation. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2012;2:43-47. (In Russian). EDN: PIIQXJ.

10. Krotova M.G., Lunitsyn V.G. Effectiveness of using enzymes of microbial origin in maral raw stuff processing. *Siberian Herald of Agricultural Science*. 2017;47(5):97-103. (In Russian). DOI: 10.26898/0370-8799-2017-5-12. EDN: TLOWWE.

11. Nowicka W., Machoy Z., Gutowska I., Nocer I., Piotrowska S., Chlubek D. Contents of calcium, magnesium, and phosphorus in antlers and cranial bones of the European Red Deer (*Cervus Elaphus*) from different regions in Western Poland. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2006 15(2):297-301.

12. Rong X., Chu W., Zhang H., Wang Y., Qi X., Zhang G., et al. Antler stem cell-conditioned medium stimulates regenerative wound healing in rats. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10:326. DOI: 10.1186/s13287-019-1457-9.

13. Owens S.L., Ahmed S.R., Lang Harman R.M., Stewart L.E., Mori S. Natural products that contain higher homologated amino acids. *ChemBioChem*. 2024;25(9):e202300822. DOI: 10.1002/cbic.202300822.

14. Subbotina M.A. Physiological aspects of the use of fats in the nourishment. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2009;4:54-57. (In Russian). EDN: KYQOV.

15. Yoo J., Lee J., Zhang M., Mun D., Kang M., Yun B., Yong-An K., et al. Enhanced γ -aminobutyric acid and sialic acid in fermented deer antler velvet and immune promoting effects. *Journal of Animal Science and Technology*. 2022;64(1):166-182. DOI: 10.5187/jast.2021.e132.

16. Donskova L.A., Belyaev N.M., Leiberova N.V. Fatty-acid composition of lipids as functional purpose indicator of poultry meat products from: theoretical and practical aspects. *Food Industry*. 2018;3(1):4-10. (In Russian). DOI: 10.29141/2500-1922-2018-6-1-1. EDN: LBLIAX.

17. Bao X., Wu J. Impact of food-derived bioactive peptides on gut function and health. *Food Research International*. 2021;147:110485. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110485.

18. Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*. 2000;11(7):254-262. DOI: 10.1016/S0924-2244(01)00007-3.

19. Li-Chan E.C. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*. 2015;1:28-37. DOI: 10.1016/j.cofs.2014.09.005.

20. Chen X., Xia P., Zheng S., Li Y., Fang J., Ma Z., et al. Antioxidant peptides from the collagen of antler ossified tissue and their protective effects against H₂O₂-induced oxidative damage toward HaCaT cells. *Molecules*. 2023;28(19):6887. DOI: 10.3390/molecules28196887.

21. Koroleva O.V., Agarkova E.Yu., Botina S.G., Nikolaev I.V., Ponomareva N.V., Melnikova E.I., et al. Prospects of applying whey protein hydrolysates in the fermented milk products technology. *Dairy industry*. 2013;7:66-68. (In Russian). EDN: QJCRCX.

22. Beach-Larsen T., Scholderer J. Functional food

in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects. *Trends in Food Science & Technology*. 2007;18(4):231-234. DOI: 10.1016/j.tifs.2006.12.006.

23. Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*. 2006;16(9):945-960. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.10.012.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Гришаева Ирина Николаевна,

к.б.н., ведущий научный сотрудник,
заведующая лабораторией,
Федеральный Алтайский
научный центр агробиотехнологий,
656910, г. Барнаул, Научный городок, 35,
Российская Федерация,
✉ otdel_wniipo@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5172-4143>

Кротова Мария Георгиевна,

к.с.-х.н., старший научный сотрудник отдела,
Федеральный Алтайский
научный центр агробиотехнологий,
656910, г. Барнаул, Научный городок, 35,
Российская Федерация,
maria11101984@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7878-8529>

Вклад авторов

И.Н. Гришаева – разработка концепции исследования, статистическая оценка полученных результатов, написание текста статьи.

М.Г. Кротова – подготовка образцов, осуществление расчетов, обсуждение результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 01.04.2024.
Одобрена после рецензирования 04.07.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina N. Grishaeva,

Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher,
Head of the Laboratory,
Federal Altai Scientific Center
of Agrobiotechnologies,
35, Scientific town, Barnaul, 656910,
Russian Federation,
✉ otdel_wniipo@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5172-4143>

Maria G. Krotova,

Cand. Sci. (Agriculture), Senior Researcher,
Federal Altai Scientific Center
of Agrobiotechnologies,
35, Scientific town, Barnaul, 656910,
Russian Federation,
maria11101984@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7878-8529>

Contribution of the authors

Irina N. Grishaeva – research concept development, statistical evaluation of the results obtained, writing the text of manuscript.

Maria G. Krotova – sample preparation, calculations, results discussion.

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 01.04.2024.
Approved after reviewing 04.07.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.

BRIEF COMMUNICATION

EDN: ONJTWU
DOI: 10.21285/achb.930



Physico-chemical characteristics of melanins culture medium *Inocutis dryophila* (Berk) Flasjon & Niemela

Tatyana G. Gornostai

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

Abstract. The purpose of the study was to investigate the effect of light treatment on the synthesis of endomelanins from the mycelium of *Inocutis dryophila* in a liquid culture medium. To identify the effect of light on the synthesis of melanins, the mycelium of *Inocutis dryophila* was cultivated in a liquid medium in the dark and using blue light treatment. As a result, two types of melanins IDM-1 and IDM-2 were obtained. It has been established that the light factor influences the quantitative release of melanins from the mycelium of *Inocutis dryophila* into the culture liquid. The use of blue light resulted in lower melanin content in the culture fluid than in the dark. Ultraviolet and infrared spectrometry showed that both types of melanins have typical spectra and graphs for fungal melanins. Infrared spectrometry showed that treatment of mycelium with blue light led to deformation of IDM-1. It was revealed that IDM-2 melanins exhibit greater antiradical activity than IDM-1 melanins. Thus, light treatment of *Inocutis dryophila* mycelium in a liquid medium affects the quantitative release of melanins into the culture liquid, promotes a change in the structure, as well as manifestation of a biological effect.

Keywords: *Inocutis dryophila*, culture medium, melanin, blue light, UV-, IR-spectrometry.

Acknowledgment. For the study, the equipment of the Center for Collective Use "Bioanalitika" of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Irkutsk) was used.

Funding. Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation supported this study within the framework of the state task for Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (Project State Registration no. 122041100049-0).

For citation: Gornostai T.G. Physico-chemical characteristics of melanins culture medium *Inocutis dryophila* (Berk) Flasjon & Niemela. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):416-420. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.930. EDN: ONJTWU.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 582.284

Физико-химическая характеристика меланинов культуральной среды *Inocutis dryophila* (Berk) Flasjon & Niemela

Т.Г. Горностай

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

Аннотация. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния световой обработки на синтез эндомеланинов мицелия *Inocutis dryophila* в жидкую культуральную среду. Для выявления действия света на синтез меланинов проводили культивирование мицелия *Inocutis dryophila* на жидкой среде в темноте и с применением обработки синими светодиодами. В результате были получены два вида меланинов IDM-1 и IDM-2. Установлено, что световой фактор оказывает влияние на количественный выход меланинов из мицелия *Inocutis dryophila* в культуральную жидкость. Применение синего света приводило к меньшему содержанию меланина в культуральной жидкости по сравнению с количеством меланина, полученного в темноте. Методом ультрафиолетовой и инфракрасной спектрометрии выявлено, что оба вида меланинов имеют типичные спектры и графики для

грибных меланинов. В ходе инфракрасной спектроскопии было обнаружено, что обработка мицелия синим светом приводила к деформации молекул меланинов IDM-1. Установлено, что меланины IDM-2 проявляли большую антирадикальную активность, чем меланины IDM-1. Таким образом, при глубинном культивировании световая обработка мицелия *Inocutis dryophila* оказывает влияние на количественный выход меланинов в культуральную жидкость, вносит вклад в изменение структуры, а также проявление биологического эффекта.

Ключевые слова: *Inocutis dryophila*, культуральная жидкость, меланины, синий свет, ультрафиолетовая и инфракрасная спектроскопия

Благодарности. В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск, Российская Федерация).

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Минобрнауки России для Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (рег. № НИОКТР – 122041100049-0).

Для цитирования: Горноста́й Т.Г. Физико-химическая характеристика меланинов культуральной среды *Inocutis dryophila* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. № 3. С. 416–420. DOI: 10.21285/achb.930. EDN: ONJTUW.

INTRODUCTION

Melanins are biopolymers, widespread in nature, having diverse origins, structures and functions, and are currently actively used and introduced into various areas of industry [1, 2]. Considering the complexity of the melanins structure of, currently the number of fungi used to obtain melanins remains small, so the search and characterization of new species of fungi as a potential source of melanins is an urgent task. Basidial fungi have already proven themselves as a source of highly active melanins [3, 4]. The most extensively studied genera include the melanins of *Inonotus obliquus* [5–7], revealing a wide range of activities [7–9]. The genus *Inocutis* is a closely related taxon to *Inonotus* [10], whose representatives have been little studied, but they may probably be no less promising objects for obtaining biologically active substances. We previously discovered that *Inocutis dryophila* is characterized by a high rate of mycelial growth on solid and liquid media. This study examines the possibility of obtaining fungal melanins from the culture liquid of the basidiomycete fungus *I. dryophila* using lighting.

EXPERIMENTAL

We used a pure culture of the basidiomycete fungus *Inocutis dryophila* (Berk) Flasson & Niemela strain 1422. Mycelium cultivation was carried out in 250 ml flasks containing 160 ml of wort-agarized liquid medium of the following composition: water 120 ml, unhopped light wort 40 ml, sucrose 1,6 g, glucose 1,6 g. The duration of cultivation was 30 days at a temperature of 25 °C, on a shaker at 140 rpm, under continuous illumination with blue LEDs with a luminous flux intensity of 12,8 W/m², and in the dark. Afterwards, filtration was carried out using a vacuum pump to separate the mycelium from the culture medium, followed by the isolation of melanin from the culture medium, as described in the method [11] and obtaining two types of melanins: IDM-1 – melanin from the culture liquid of *I. dryophila*, obtained on blue light and IDM-2 – melanin from the culture liquid of *I. dryophila*, obtained in the dark.

Samples for IR spectroscopy were dissolved in the 10% NH₃ solution, the solution was applied to thallium-bromine-iodine glass plates (KRS-5) and dried in vacuum.

IR spectra were recorded on a Spectrum 100 IR-Fourier spectrometer (Perkin-Elmer, USA) in film in the range of 4000–450 cm⁻¹.

Antiradical activity was determined with ABTS radical according to the method [12].

The experiment was carried out in three biological replicates. Data were expressed as the mean and their standard deviation. The results were processed using Microsoft Excel. Differences between experimental data were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

As a result of isolating mycelium from the culture medium, melanin IDM-1 and IDM-2 were obtained, which is an amorphous substance of dark brown color, insoluble in water, acids and organic solvents, but highly soluble in aqueous solutions of alkalis.

It was shown that the light factor affects the yield of melanin in the culture liquid of *I. dryophila*, so the use of blue light led to a decrease in melanin content compared to darkness during mycelium cultivation, the yield of IDM-1 and IDM-2 was 1,443 and 1,663 g/l, respectively. Regulation of melanin synthesis was previously shown for *I. obliquus*; however, the opposite pattern in its accumulation is observed [13].

The UV spectrum of melanins alkaline solutions is typical for representatives of this class of compounds; it lacked absorption bands in the visible wavelength range with a characteristic linear dependence of the optical density logarithm on wavelength (Fig. 1).

Regression analysis showed that in the equations of this dependence ($\log D = a\lambda + b$) the values of the coefficient of determination r^2 were in the range of 0,9706–0,9759, and the values of the regression analysis were – 0,0039 to – 0,0042, this is consistent with previously published data on fungal melanins [14]. The chromatic coefficients E465/E665 of melanins were 6,24 and 6,59, indicating the presence of aliphatic and O-containing functional groups.

During the analysis of IR spectroscopy, it was found that the graphs typical for fungal melanins are in the wavelength ranges from 3600 to 3000 cm⁻¹, from 1650 to 1600 cm⁻¹ and from 1500 to 1400 cm⁻¹ [15, 16] (Fig. 2).

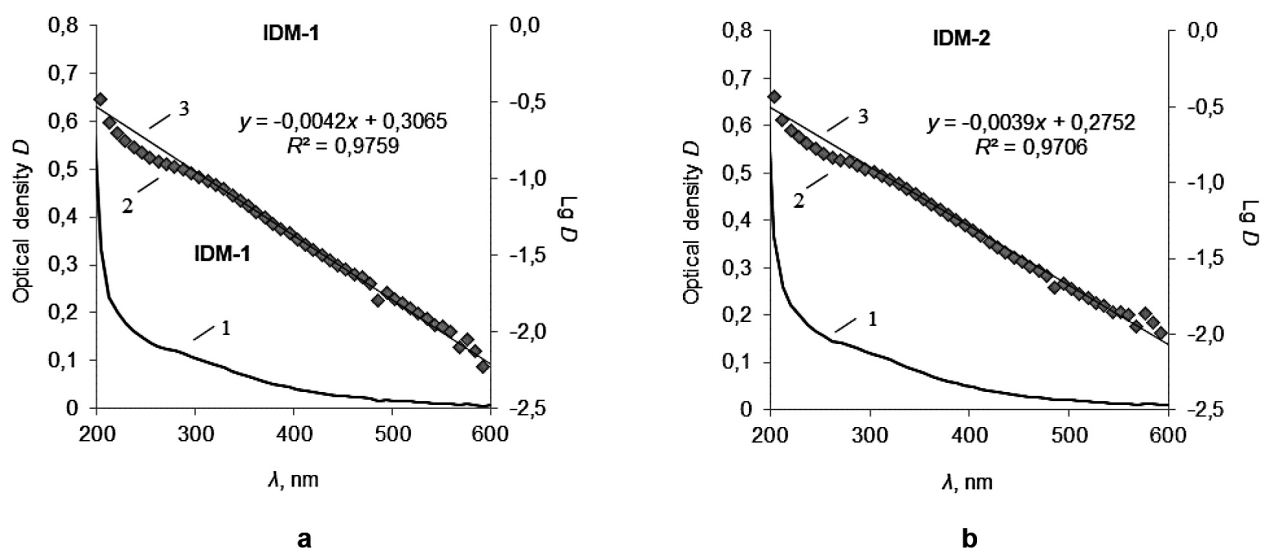


Fig. 1. Dependency graphs for melanins *Inocutis dryophila* IDM-1 (blue light) (a) and IDM-2 (dark light) (b): 1 – absorption spectrum of 0,002% solutions of *Inocutis dryophila* melanins; 2 – dependence of the logarithm of optical density on wavelength; 3 – linear regression graph for the $\lambda - \lg D$ dependence

Рис. 1. Графики зависимостей для меланинов *Inocutis dryophila* IDM-1 (синий свет) (a) и IDM-2 (темнота) (b): 1 – спектр поглощения 0,002%-х растворов меланинов *Inocutis dryophila*; 2 – зависимость логарифма оптической плотности от длины волны; 3 – график линейной регрессии для зависимости $\lambda - \lg D$

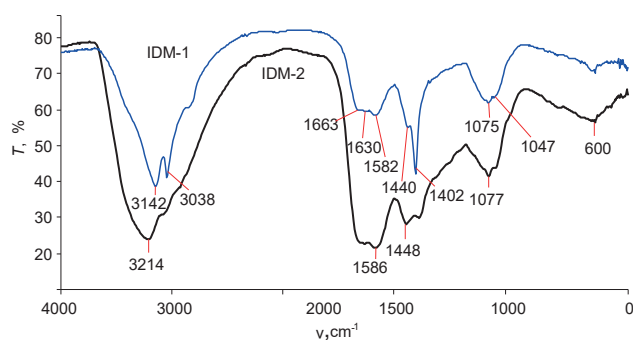


Fig. 2. IR spectrum of *Inocutis dryophila* melanins IDM-1 (blue light) and IDM-2 (dark light)

Рис. 2. ИК-спектр меланинов *Inocutis dryophila* IDM-1 (синий свет) и IDM-2 (темнота)

Broad bands are in the region of 3000–3300 cm^{-1} , due to stretching vibrations of OH bound to NH [17]. The existence of aliphatic fragments ($\text{C}=\text{H}-$, CH_2- , CH_3-) was confirmed by bands in the region of 2913–2020 cm^{-1} and 1439–1448 cm^{-1} [6]. Strong bands at 1663–1656 cm^{-1} are corresponding to the stretching vibrations of $\text{C}=\text{O}$ and NH groups of secondary amides. Vibrations of the aromatic regions of the carboxyl function $\text{C}=\text{C}$ and $\text{C}=\text{O}$ are usually associated with a strong, characteristic absorption band between 1650 and 1600 cm^{-1} [18]. The bands in the 1600 cm^{-1} region are associated with vibrations on the $\text{CH}=\text{CH}$ bond plane [19]. The peak of

NH vibration and the peak of stretching vibration of $\text{CN}-$ are at 1582–1586 cm^{-1} and 1400 cm^{-1} , which indicates the melanin structure typical of indole [20]. The presence of vibrations of the OH- group (tertiary alcohols) in the region of 1402–1310 cm^{-1} was also characteristic. The bands in the spectral region 1070–1047 cm^{-1} belong to hydroxyl, alcohol and phenol groups, respectively [19]. There are vibrations at 750–650 cm^{-1} OH of the bound group, CS at 700–600 cm^{-1} , O-NO at 600 cm^{-1} [20]. IR spectrometry showed that irradiation with blue light leads to deformation of IDM-1 melanin molecules. During the analysis of the antiradical activity of the obtained melanins using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS+ method) it was revealed that the light factor influences the degree of manifestation of this type of activity. Melanins content of *I. dryophila* obtained in the dark is higher. It was established that the activity of IDM-2 was $\text{IC}_{50} = 1,21 \mu\text{g/ml}$, IDM-1 $\text{IC}_{50} = 1,51 \mu\text{g/ml}$, both values are higher than those indicated in the literature for *I. obliquus* melanins, obtained by the same method [6]. All data indicated for *I. dryophila* are presented for the first time.

CONCLUSION

Thus, the production of melanins from the culture liquid of *I. dryophila* is a promising source of highly active melanin, and it has been shown that cultivation in the dark has greater yield and activity, which is undoubtedly a big advantage for economically beneficial mass production of melanin.

REFERENCES

1. Mavridi-Printezi A., Guernelli M., Menichetti A., Montalti M. Bio-applications of multifunctional melanin nanoparticles: from nanomedicine to nanocosmetics. *Nanomaterials*. 2020;10(11):2276. DOI: 10.3390/nano10112276.
2. Guo L., Li W., Gu Z., Wang L., Guo L., Ma S., et al. Recent advances and progress on melanin: from source to application. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(5):4360. DOI: 10.3390/ijms24054360.

3. Liu R., Meng X., Mo C., Wei X., Ma A. Melanin of fungi: from classification to application. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022;38:228. DOI: 10.1007/s11274-022-03415-0.
4. Suthar M., Dufossé L., Singh S.K. The enigmatic world of fungal melanin: a comprehensive review. *Journal of Fungi*. 2023;9(9):891. DOI: 10.3390/jof9090891.
5. Kukulyanskaya T.A., Kurchenko N.V., Kurchenko V.P., Babitskaya V.G. Physicochemical properties of melanins produced by the sterile form of *Inonotus obliquus* ("Chagi") in natural and cultivated fungus. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2002;38:58-61. DOI: 10.1023/A:1013204706055.
6. Olennikov D.N., Tankhaeva M., Rokhin A.V., Agafonova S.V. Physicochemical properties and antioxidant activity of melanin fractions from *Inonotus obliquus* sclerotia. *Chemistry of Natural Compounds*. 2012;48:396-403. DOI: 10.1007/s10600-012-0260-y.
7. Wold C.W., Gerwick W.H., Wangenstein H., Inngjerdingen K.T. Bioactive triterpenoids and water-soluble melanin from *Inonotus obliquus* (Chaga) with immunomodulatory activity. *Journal of Functional Foods*. 2020;71:104025. DOI: 10.1016/j.jff.2020.104025.
8. Burmasova M.A., Utebaeva A.A., Sysoeva E.V., Sysoeva M.A. Melanins of *Inonotus obliquus*: bifidogenic and antioxidant properties. *Biomolecules*. 2019;9(6):248. DOI: 10.3390/biom9060248.
9. Parfenov A.A., Vyshtakalyuk A.B., Sysoeva M.A., Sysoeva E.V., Latipova A.D., Gumarova L.F., Zobov V.V. Hepatoprotective effect of *Inonotus obliquus* melanins: *in vitro* and *in vivo* studies. *BioNanoScience*. 2019;9:528-538. DOI: 10.1007/s12668-019-0595-y.
10. Spirin W.A., Zmitrovich I.V., Malysheva V.F. To the systematics of *Phellinus* s. l. and *Inonotus* s. l. (Mucronoporaceae, Hymenochaetales). *Novosti sistematiki nizshikh rastenii*. 2006;40:153-188. (In Russian). EDN: KHNDHJ.
11. Ilyicheva T.N., Anan'ko G.G., Kosogova T.A., Olkin S Ye., 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. *Chemistry of plant raw material*. 2020;2:283-289. (In Russian). DOI: 10.14258/jcpm.2020025167. EDN: OPSRWL.
12. Ding H.-Y., Chou T.-H., Liang C.-H. Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare*. *Food Chemistry*. 2010;123(2):254-262. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.04.025.
13. Poyedinok N., Mykhaylova O., Tugay T., Tugay A., Negriyko A., Dudka I. Effect of light wavelengths and coherence on growth, enzymes activity, and melanin accumulation of liquid-cultured *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilát. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015;176:333-343. DOI: 10.1007/s12010-015-1577-3.
14. Suryanarayanan T.S., Ravishankar J.P., Venkatesan G., Murali T.S. Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte. *Mycological Research*. 2004;108(8):974-978. DOI: 10.1017/s0953756204000619.
15. Babitskaya V.G., Shcherba V.V., Ikonnikova V.L. Melanin complex of the fungus *Inonotus obliquus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2000;36:377-381. DOI: 10.1007/BF02738046.
16. Ribera J., Panzarasa G., Stobbe, A., Osypova A., Rupper P., Klose D., Schwarze F.W.M.R. Scalable biosynthesis of melanin by the basidiomycete *Armillaria cepistipes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;67(1):132-139. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b05071.
17. Hou R., Liu X., Xiang K., Chen L., Wu X., Lin W., et al. Characterization of the physicochemical properties and extraction optimization of natural melanin from *Inonotus hispidus* mushroom. *Food Chemistry*. 2019;277:533-542. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.002.
18. Wang L., Li Y., Li Y. Metal ions driven production, characterization and bioactivity of extracellular melanin from *Streptomyces* sp. ZL-24. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;123:521-530. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.061.
19. Bilińska B. Progress of infrared investigations of melanin structures. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 1996;52(9):1157-1162. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.061.
20. Ye M., Guo G., Lu Y., Song S., Wang H., Yang L. Purification, structure and anti-radiation activity of melanin from *Lachnum* YM404. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014;63:170-176. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.10.046.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Mavridi-Printezi A., Guernelli M., Menichetti A., Montalti M. Bio-applications of multifunctional melanin nanoparticles: from nanomedicine to nanocosmetics // *Nanomaterials*. 2020. Vol. 10, no. 11. P. 2276. DOI: 10.3390/nano10112276.
2. Guo L., Li W., Gu Z., Wang L., Guo L., Ma S., et al. Recent advances and progress on melanin: from source to application // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, no. 5. P. 4360. DOI: 10.3390/ijms24054360.
3. Liu R., Meng X., Mo C., Wei X., Ma A. Melanin of fungi: from classification to application // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022. Vol. 38. P. 228. DOI: 10.1007/s11274-022-03415-0.
4. Suthar M., Dufossé L., Singh S.K. The enigmatic world of fungal melanin: a comprehensive review // *Journal of Fungi*. 2023. Vol. 9, no. 9. P. 891. DOI: 10.3390/jof9090891.
5. Kukulyanskaya T.A., Kurchenko N.V., Kurchenko V.P., Babitskaya V.G. Physicochemical properties of melanins produced by the sterile form of *Inonotus obliquus* ("Chagi") in natural and cultivated fungus // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2002. Vol. 38. P. 58-61. DOI: 10.1023/A:1013204706055.
6. Olennikov D.N., Tankhaeva M., Rokhin A.V., Agafonova S.V. Physicochemical properties and antioxidant activity of melanin fractions from *Inonotus obliquus* sclerotia // *Chemistry of Natural Compounds*. 2012. Vol. 48. P. 396-403. DOI: 10.1007/s10600-012-0260-y.
7. Wold C.W., Gerwick W.H., Wangenstein H., Inngjerdingen K.T. Bioactive triterpenoids and water-soluble melanin from *Inonotus obliquus* (Chaga) with immunomodulatory activity // *Journal of Functional Foods*. 2020. Vol. 71. P. 104025. DOI: 10.1016/j.jff.2020.104025.
8. Burmasova M.A., Utebaeva A.A., Sysoeva E.V., Sysoeva M.A. Melanins of *Inonotus obliquus*: bifidogenic and antioxidant properties // *Biomolecules*. 2019. Vol. 9, no. 6. P. 248. DOI: 10.3390/biom9060248.
9. Parfenov A.A., Vyshtakalyuk A.B., Sysoeva M.A., Sysoeva E.V., Latipova A.D., Gumarova L.F., Zobov V.V. Hepatoprotective effect of *Inonotus obliquus* melanins: *in vitro* and *in vivo* studies. *BioNanoScience*. 2019. Vol. 9:528-538. DOI: 10.1007/s12668-019-0595-y.

in vitro and *in vivo* studies // BioNanoScience. 2019. Vol. 9. P. 528–538. DOI: 10.1007/s12668-019-0595-y.

10. Спирин В.А., Змитрович И.В., Малышева В.Ф. К систематике *Phellinus* s. l. и *Inonotus* s. l. (Муренопоросеае, Нупеночаеаля) // Новостя систематякы нязшх растеняй. 2006. Т. 40. С. 153–188. EDN: KHNDHJ.

11. Ильичева Т.Н., Ананько Г.Г., Косогова Т.А., Олькын С.Е., Омйгов В.В., Таранов О.С. [и др.]. Противовирусная активностъ меланина из Чагы (*Inonotus obliquus*), полученного на основе культивирования штамма F-1244, выделенного в чистую культуру // Химия растительного сырья. 2020. N 2. С. 283–289. DOI: 10.14258/jcprm.2020025167. EDN: OPSRWL.

12. Ding H.-Y., Chou T.-H., Liang C.-H. Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare* // Food Chemistry. 2010. Vol. 123, no. 2. P. 254–262. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.04.025.

13. Poyedinok N., Mykhaylova O., Tugay T., Tugay A., Negriyko A., Dudka I. Effect of light wavelengths and coherence on growth, enzymes activity, and melanin accumulation of liquid-cultured *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilát // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2015. Vol. 176. P. 333–343. DOI: 10.1007/s12010-015-1577-3.

14. Suryanarayanan T.S., Ravishankar J.P., Venkatesan G., Murali T.S. Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte // Mycological Research. 2004. Vol. 108, no. 8. P. 974–978. DOI: 10.1017/s0953756204000619.

15. Babitskaya V.G., Shcherba V.V., Ikonnikova V.L. Melanin complex of the fungus *Inonotus obliquus* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2000. Vol. 36. P. 377–381. DOI: 10.1007/BF02738046.

16. Ribera J., Panzarasa G., Stobbe, A., Osypova A., Rupper P., Klose D., Schwarze F.W.M.R. Scalable biosynthesis of melanin by the basidiomycete *Armillaria cepistipes* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2018. Vol. 67, no. 1. P. 132–139. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b05071.

17. Hou R., Liu X., Xiang K., Chen L., Wu X., Lin W., et al. Characterization of the physicochemical properties and extraction optimization of natural melanin from *Inonotus hispidus* mushroom // Food Chemistry. 2019. Vol. 277. P. 533–542. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.002.

18. Wang L., Li Y., Li Y. Metal ions driven production, characterization and bioactivity of extracellular melanin from *Streptomyces* sp. ZL-24 // International Journal of Biological Macromolecules. 2019. Vol. 123. P. 521–530. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.061.

19. Bilińska B. Progress of infrared investigations of melanin structures // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 1996. Vol. 52, no. 9. P. 1157–1162. DOI: 10.1016/0584-8539(96)01691-1.

20. Ye M., Guo G., Lu Y., Song S., Wang H., Yang L. Purification, structure and anti-radiation activity of melanin from *Lachnum* YM404 // International Journal of Biological Macromolecules. 2014. Vol. 63. P. 170–176. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.10.046.

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Tatyana G. Gornostai,

Cand. Sci. (Pharmaceutics), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
t.g.gornostay@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1120-2148>

Contribution of the author

The author performed the research, made a generalization on the basis of the results obtained and prepared the copyright for publication.

Conflict interests

Author declares no conflict of interests regarding the publication of this article.

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

Information about the article

The article was submitted 22.05.2024.
Approved after reviewing 04.07.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Горностай Татьяна Геннадьевна,

к.фарм.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
t.g.gornostay@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1120-2148>

Вклад автора

Автор выполнил исследовательскую работу, на основании полученных результатов провел обобщение, подготовил рукопись к печати.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Автор прочел и одобрил окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 22.05.2024.
Одобрена после рецензирования 04.07.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.



Нативная организация альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ NDA и NDB в митохондриях этиолированных проростков гороха

И.В. Уколова✉, М.А. Кондакова, Г.Б. Боровский

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

Аннотация. Многочисленные биохимические и структурные исследования нативной организации системы окислительного фосфорилирования в митохондриях различных эукариотических организмов убедительно показали, что дыхательные комплексы могут ассоциировать друг с другом с образованием структур более высокого порядка, называемых суперкомплексами. Растительные митохондрии отличаются более сложной организацией дыхательной цепи в связи с присутствием целого ряда альтернативных оксидоредуктаз. Считается, что эти ферменты физически не взаимодействуют с ферментами цитохромного пути. Однако имеющиеся литературные данные, полученные на митохондриях дрожжей, указывают на возможность такой ассоциации. В связи с этим целью исследования явилось изучение нативной организации альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ NDA и NDB в растительных митохондриях. В работе использовали 6-суточные этиолированные проростки гороха. При помощи комбинированного использования методов 2D BN/SDS-PAGE и иммунохимии обнаружено, что в органеллах гороха основная часть популяций альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ NDA и NDB входит в состав надструктур с массами 700, 780 и 900 кДа. Дополнительно NDA детектируется в области 1480 и 1600 кДа, а NDB – 1330, 340 и 100–120 кДа. Анализ субъединичных профилей выявленных ассоциаций и колориметрическая детекция АТФ-азной активности в 1D BN-геле позволяют предположить, что мажорная часть популяций NDA и NDB, идентифицированных при помощи имеющихся антител, связана с АТФ-синтазой и находится в виде гетерогенной популяции АТФ-синтасом с предполагаемым составом $NDA_2/NDB_2Va/b_{1-2}$. Остальная часть ферментов, по-видимому, входит в состав суперкомплексов NDA_2/NDB_2III_2IV и $NDA_2IV_1Va_2$. Физиологическое значение ассоциации альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ с АТФ-синтазой требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: митохондрии, система окислительного фосфорилирования, альтернативные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы, *Pisum sativum*, суперкомплексы

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

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Минобрнауки России для Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (рег. № НИОКТР – 122041100049-0).

Для цитирования: Уколова И.В., Кондакова М.А., Боровский Г.Б. Нативная организация альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ NDA и NDB в митохондриях этиолированных проростков гороха // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 421–427. DOI: 10.21285/achb.926. EDN: OLEORE.

Native organization of alternative NAD(P)H-dehydrogenases NDA and NDB in mitochondria of etiolated pea sprouts

Irina V. Ukolova✉, Marina A. Kondakova, Gennadii B. Borovskii

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

Abstract. Numerous biochemical and structural studies into the native organization of oxidative phosphorylation in the mitochondria of various eukaryotic organisms have convincingly shown that respiratory complexes can associate with one another to form higher-order structures referred to as supercomplexes. Plant mitochondria are distinguished by a more complicated organization of the respiratory chain due to the presence of a number of alternative oxidoreductases. It is considered that these enzymes do not physically interact with those of the cytochrome pathway. However, the available literature data obtained on yeast mitochondria suggests the possibility of such an association. In this regard, we aimed to study the native organization of alternative NAD(P)H-dehydrogenases NDA and NDB in plant mitochondria. The work was performed on six-day etiolated pea seedlings. The 2D BN/SDS-PAGE in combination with immunochemistry found that, in pea organelles, the main part of the populations of NDA and NDB alternative NAD(P)H dehydrogenases were included in superstructures with masses of 700, 780, and 900 kDa. Additionally, NDA was detected in the region of 1480 and 1600 kDa, and NDB was registered at values of 1330, 340, and 100–120 kDa. An analysis of subunit profiles of the observed associations and a colorimetric detection of ATPase activity in 1D BN-gel suggested that the major part of the NDA and NDB populations identified by the available antibodies was associated with ATP synthase and represented a heterogeneous population of ATP-synthasomes, assumably, with a NDA₂/NDB₂Va/b₁₋₂ composition. The rest of the enzymes were likely to be part of the NDA₂/NDB₂III₂IV and NDA₂IV₁Va₂ supercomplexes. The physiological significance of the association of alternative NAD(P)H dehydrogenases with ATP synthase requires further study.

Keywords: mitochondria, oxidative phosphorylation system, alternative NAD(P)H dehydrogenases, *Pisum sativum*, supercomplexes

Acknowledgements. The equipment of the Center for Collective Use “Bioanalitika” of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS was used in the work (Irkutsk).

Funding. Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation supported this study within the framework of the state task for Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (registration number 122041100049-0).

For citation: Ukolova I.V., Kondakova M.A., Borovskii G.B. Native organization of alternative NAD(P)H-dehydrogenases NDA and NDB in mitochondria of etiolated pea sprouts. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):421-427. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.926. EDN: OLEORE.

ВВЕДЕНИЕ

Надмолекулярная организация системы окислительного фосфорилирования (системы ОКСФОС) митохондрий активно изучается в различных эукариотических организмах, включая млекопитающих, грибы, растения и ряд протистов. В настоящее время выделены и структурно охарактеризованы основные суперкомплексы ОКСФОС, типичные для большинства изученных таксонов, а именно: дыхательные суперкомплексы I₁III₂, III₂IV₁₋₂, I₁₋₂III₂IV₁₋₂, а также димерная АТФ-синтаза [1–4]. Растительные митохондрии, благодаря присутствию многочисленных альтернативных оксидоредуктаз, отличаются более сложной и разветвленной системой дыхательной цепи по сравнению с органеллами млекопитающих [5]. Так, в митохондриях *Arabidopsis thaliana* обнаружено присутствие семи генов альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ, которые на основании филогенетического анализа объединяются в три подсемейства: NDA1-2, NDB1-4 и NDC1 [6, 7]. Гены NDA1-2 и NDC1 кодируют внутренние НАД(Ф)Н-дегидрогеназы NDA1-2 и NDC1, локализованные

с внутренней стороны митохондриальной мембраны, а NDB1-4 – внешние ферменты NDB1-4, расположенные соответственно с наружной стороны мембраны. Альтернативная оксидаза также представлена набором изоформ, которые кодируются генами АОХ1-2 у двудольных и АОХ1 у однодольных растений [8].

Считается, что альтернативные ферменты не входят в состав суперкомплексов [9]. В то же время в митохондриях дрожжей была обнаружена надмолекулярная структура, включающая, помимо других ферментов, альтернативные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы и комплексы II и III₂ [10], а также были выявлены ассоциации этих альтернативных ферментов с суперкомплексом III₂IV₁₋₂ [11, 12]. Кроме того, на основании данных комплексного профилирования митохондриального протеома из листьев *A. thaliana* было предположено, что альтернативные ферменты сами могут формировать «альтернативные респирасомы», существующие отдельно от других ферментов дыхательной цепи [13]. При помощи методов 2D BN/SDS-PAGE, иммунохимии, а также энзимографии

1D BN-гелей на примере митохондрий проростков гороха мы впервые показали, что в растительных органеллах альтернативные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы NDA и NDB могут ассоциировать с ферментами ОКСФОС с образованием АТФ-синтасом с предполагаемым составом $NDA_2/NDB_2Va/b_{1-2}$, респирасом NDA_2/NDB_2III_2IV и минорного суперкомплекса $NDA_2IV_1Va_2$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

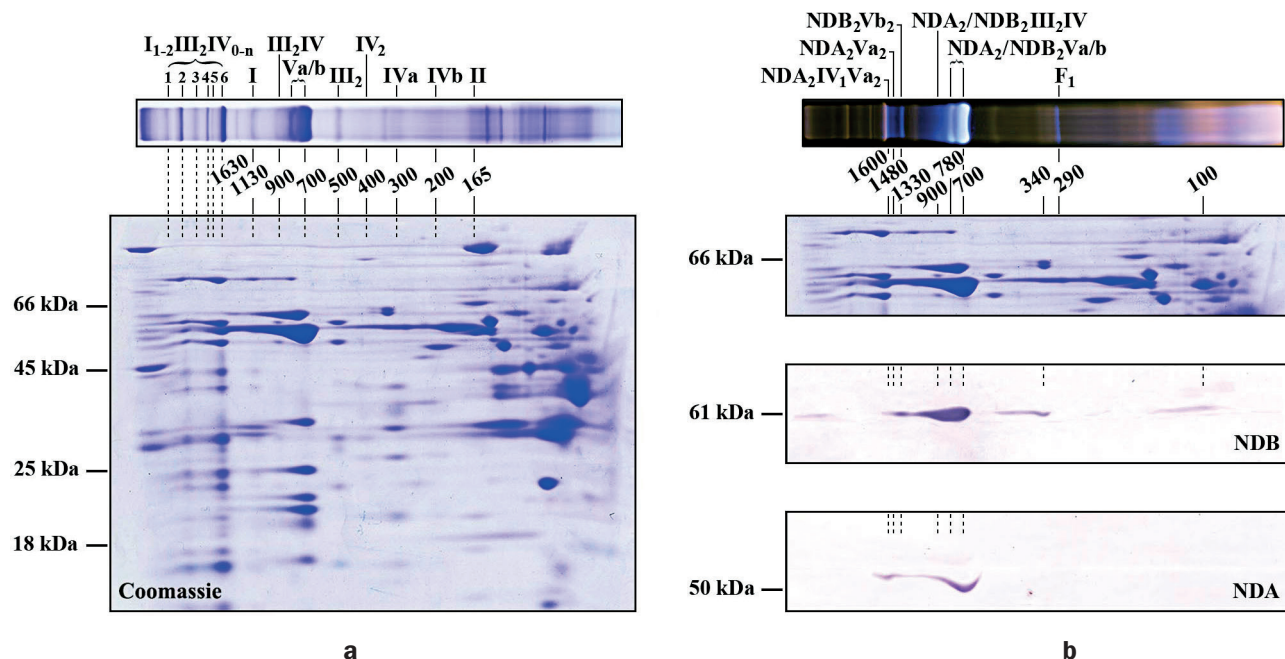
В работе использовали этилированные 6-суточные проростки гороха (*Pisum sativum* L., сорт Аксайский усатый 55), выращенные в темноте на влажной фильтровальной бумаге при температуре 20 °С. Выделение и очистку митохондрий из этилированных побегов проводили согласно ранее опубликованной методике [14]. Митохондриальные комплексы и суперкомплексы солибилизировали при помощи дигитонина в соотношении детергента и белка 5:1 [14]. Изучение состава и субъединичных профилей солибализованных белков и их ассоциаций проводили при помощи методов 1D BN-PAGE и 2D BN/SDS-PAGE соответственно [15, 16]. Комплекс V в 1D BN-гелях визуализировали по АТФ-азной активности согласно методике [17]. Иммунохимическую детекцию альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ NDA и NDB на иммуноблотах после 2D BN/SDS-PAGE осуществляли при помощи антител на NDA1 и NDB1 картофеля, которые были любезно предоставлены доктором А.Г. Расмус-

соном [18]. Учитывая рекомендации производителя и тот факт, что антитела на указанные белки в различных видах могут реагировать с разными изоформами, мы обозначили детектируемые ферменты как общие NDA и NDB неизвестного состава. Эксперименты выполнены в трех биологических повторностях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наши ранние исследования организации системы ОКСФОС в митохондриях побегов гороха показали, что система включает следующие структурные компоненты: мегакомплекс $(II_xIII_1IV_z)_n$, респирасомы $I_{1-2}III_2IV_{1-n}$, мажорный суперкомплекс I_1III_2 , минорную ассоциацию IV_1Va_2 , минорные количества суперкомплексов III_2IV_{1-2} , а также димерные и мономерные формы комплексов ОКСФОС [14, 19] (см. рисунок а). Следует отметить, что суперкомплекс IV_1Va_2 и форма АТФ-синтазы Va_{1-2} были обнаружены впервые. Было показано, что вместо предполагаемой ранее ассоциации $I_1III_2IV_1$, включающей и внутреннюю НАД(Ф)Н-дегидрогеназу NDA [20], в соответствующей области комигрируют два отдельных суперкомплекса: мажорный суперкомплекс I_1III_2 с расчетной массой 1630 кДа и непосредственно под ним минорный суперкомплекс IV_1Va_2 с видимой массой 1600 кДа [14].

Полученные данные отражают надмолекулярную архитектуру ферментов цитохромного пути дыхания в митохондриях гороха. Изучение нативной органи-



Нативная организация внутренних и внешних НАД(Ф)Н-дегидрогеназ NDA и NDB в митохондриях этилированных побегов гороха: а – репрезентативный 2D BN/SDS-гель, окрашенный раствором Кумасси (сверху расположена полоса 1D BN-геля и указаны компоненты основного цитохромного пути системы окислительного фосфорилирования гороха и их массы; слева даны массы белков-стандартов); б – фрагменты типичных иммуноблотов NDA и NDB белков, а также соответствующий фрагмент 2D BN/SDS-геля (сверху представлена полоса 1D BN-геля после детекции АТФ-азной активности с обозначенными суперкомплексами, содержащими NDA и NDB, и даны их массы; слева приведены массы мономеров NDA и NDB)

Native organization of the internal and external NAD(P)H dehydrogenases NDA and NDB in the mitochondria of etiolated pea shoots: a – representative Coomassie-stained 2D BN/SDS-gel (1D BN-gel strip and identities of the OXPHOS main cytochrome pathway's components and their masses are given above, and protein standard masses to the left of the 2D gel); b – fragments of typical immunoblots for NDA and NDB proteins, along with the corresponding fragment of the 2D BN/SDS-gel (1D BN-gel strip after ATPase in-gel activity detection with corresponding NDA- and NDB-containing supercomplexes, and their masses are indicated above; masses of the NDA and NDB monomers are shown on the left)

зации ферментов альтернативного пути при помощи метода 2D BN/SDS-PAGE в сочетании с иммунохимической детекцией альтернативных внутренних и внешних НАД(Ф)Н-дегидрогеназ NDA и NDB показало, что эти ферменты также могут находиться в ассоциации с другими комплексами ОКСФОС. Так, внутренние дегидрогеназы NDA, имеющие видимую массу мономеров 50 кДа, солюбилизируются дигитонином в виде высокомолекулярных ассоциаций с массами 700, 780, 900, 1480 и 1600 кДа (см. рисунок б). Анализ субъединичных профилей структур и надструктур на 2D BN/SDS-гелях с указанными массами, а также колориметрическая детекция АТФ-азной активности в соответствующих областях на 1D BN-геле указывают на ассоциацию NDA с мономерами Va и Vb, димером Va₂, а также суперкомплексами IV₁Va₂ и, предположительно, III₂IV. Основная часть популяции внешних НАД(Ф)Н-дегидрогеназ NDB, имеющих видимую массу мономеров 61 кДа, также детектируется в области 700, 780, 900 кДа, что предполагает ее взаимодействие с двумя формами мономерной АТФ-синтазы, Va и Vb, а также суперкомплексом III₂IV. Минорная часть популяции солюбилизируется в ассоциации с димером Vb₂, имеющим массу 1330 кДа, следовые количества обнаружены в районе 340 и 100–120 кДа. Можно предположить, что в области 340 кДа NDB может мигрировать в составе либо разрушившейся части мембранного домена F₀ АТФ-синтазы, либо в составе другой пока неизвестной ассоциации. Следовые количества NDB в области 100–120 кДа могут соответствовать димерной форме или мономеру с оставшимися ассоциированными липидами мембраны. Наши данные по NDB частично согласуются с данными А.Г. Расмуссона и С.К. Агюс [21], полученными на митохондриях картофеля. Авторы также обнаружили часть популяции NDB этого вида в области 700 кДа на иммуноблотах 2D BN/SDS-гелей и дополнительно ряд иммунохимических NDB- и NDA-сигналов с

меньшими молекулярными массами. Последний факт, скорее всего, связан с ультразвуковым разрушением органелл в ходе пробоподготовки, вследствие чего значительная часть надструктур могла подвергнуться диссоциации. Минорные количества NDA1 и NDA2 в районе 700 кДа были также обнаружены в результате комплексного профилирования митохондриального протеома *A. thaliana* [13]. В этом же кластере детектировались и минорные количества АТФ-синтазы. Авторы предположили, что альтернативные ферменты могут взаимодействовать друг с другом, формируя высокомолекулярные «альтернативные респирасомы», однако не уточнили возможный состав этих структур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая нативные массы иммунохимически детектируемых ассоциаций NDA и NDB с АТФ-синтазой и тот факт, что альтернативные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы присутствуют во внутренней мембране митохондрий в виде димеров [5, 22] с ожидаемыми молекулярными массами 100 и 120 кДа соответственно, можно предположить, что на один фермент АТФ-синтазы с массой 600 кДа приходится один димер одной из альтернативных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ. Таким образом, мы предполагаем присутствие гетерогенных популяций АТФ-синтасом NDA₂/NDB₂Va/b в электрофоретических фракциях с массами 700 и 780 кДа. Присутствие других белков в АТФ-синтасомах, особенно в более высокомолекулярной, имеющей массу 780 кДа, не исключается. На иммуноблотах детектируются дополнительно АТФ-синтасомы с димерным комплексом V, имеющие предполагаемый состав NDB₂Vb₂ и NDA₂Va₂, а также минорные суперкомплексы NDA₂IV₁Va₂ и NDA₂/NDB₂III₂IV. Физиологическое значение ассоциации альтернативных внутренних и внешних НАД(Ф)Н-дегидрогеназ с АТФ-синтазой изучается.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Cogliati S., Cabrera-Alarcón J.L., Enriquez J.A. Regulation and functional role of the electron transport chain supercomplexes // *Biochemical Society Transactions*. 2021. Vol. 49, no. 6. P. 2655–2668. DOI: 10.1042/BST20210460.
2. Kohler A., Barrientos A., Fontanesi F., Ott M. The functional significance of mitochondrial respiratory chain supercomplexes // *EMBO Reports*. 2023. Vol. 24, no. 11. P. e57092. DOI: 10.15252/embr.202357092.
3. Kühlbrandt W. Structure and mechanisms of F-type ATP synthases // *Annual Review of Biochemistry*. 2019. Vol. 88. P. 515–549. DOI: 10.1146/annurev-biochem-013118-110903.
4. Ukolova I.V. The subcompartmented oxphosomic model of the phosphorylating system organization in mitochondria // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. Т. 25. N 7. С. 778–786. DOI: 10.18699/VJ21.089. EDN: VRUFFV.
5. Møller I.M., Rasmusson A.G., Van Aken O. Plant mitochondria – past, present and future // *The Plant Journal*. 2021. Vol. 108, no. 4. P. 912–959. DOI: 10.1111/tpj.15495.
6. Rasmusson A.G., Geisler D.A., Møller I.M. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria // *Mitochondrion*. 2008. Vol. 8, no. 1. P. 47–60. DOI: 10.1016/j.mito.2007.10.004.
7. Sweetman C., Waterman C.D., Rainbird B.M., Smith P.M.C., Jenkins C.D., Day D.A., et al. AtNDB2 is the main external NADH dehydrogenase in mitochondria and is important for tolerance to environmental stress // *Plant Physiology*. 2019. Vol. 181, no. 2. P. 774–788. DOI: 10.1104/pp.19.00877.
8. Гармаш Е.В. Сигнальные пути регуляции экспрессии генов альтернативной оксидазы растений // Физиология растений. 2022. Т. 69. N 1. С. 3–19. DOI: 10.31857/S0015330322010055. EDN: AATESI.
9. Braun H.-P. The Oxidative Phosphorylation system of the mitochondria in plants // *Mitochondrion*. 2020. Vol. 53. P. 66–75. DOI: 10.1016/j.mito.2020.04.007.
10. Grandier-Vazeille X., Bathany K., Chaignepain S., Camougrand N., Manon S., Schmitter J.M. Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex // *Biochemistry*. 2001. Vol. 40, no. 33. P. 9758–9769. DOI: 10.1021/bi010277r.
11. Guerrero-Castillo S., Vázquez-Acevedo M., González-Halphen D., Uribe-Carvajal S. In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Vol. 1787, no. 2. P. 75–85. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.10.008.
12. Matus-Ortega M.G., Cárdenas-Monroy C.A., Flores-Herrera O., Mendoza-Hernández G., Miranda M.,

González-Pedrajo B., et al. New complexes containing the internal alternative NADH dehydrogenase (Ndi1) in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* // *Yeast*. 2015. Vol. 32, no. 10. P. 629–641. DOI: 10.1002/yea.3086.

13. Senkler J., Senkler M., Eubel H., Hildebrandt T., Lengwenus C., Schertl P., et al. The mitochondrial complexome of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Journal*. 2017. Vol. 89, no. 6. P. 1079–1092. DOI: 10.1111/tpj.13448.

14. Ukolova I.V., Kondakova M.A., Kondratov I.G., Sidorov A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. New insights into the organisation of the oxidative phosphorylation system in the example of pea shoot mitochondria // *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*. 2020. Vol. 1861, no. 11. P. 148264. DOI: 10.1016/j.bbabi.2020.148264.

15. Schägger H. Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria // *Methods in Cell Biology*. 2001. Vol. 65. P. 231–244. DOI: 10.1016/S0091-679X(01)65014-3.

16. Wittig I., Braun H.-P., Schägger H. Blue native PAGE // *Nature Protocols*. 2006. Vol. 1, no. 1. P. 418–428. DOI: 10.1038/nprot.2006.62.

17. Sabar M., Balk J., Leaver C.J. Histochemical staining and quantification of plant mitochondrial respiratory chain complexes using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis // *The Plant Journal*. 2005. Vol. 44, no. 5. P. 893–901. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02577.x.

18. Svensson A.S., Rasmusson A.G. Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves // *The Plant Journal*. 2001. Vol. 28, no. 1. P. 73–82. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2001.01128.x.

19. Ukolova I.V., Borovskii G.B. OXPHOS organization and activity in mitochondria of plants with different life strategies // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, no. 20. P. 15229. DOI: 10.3390/ijms242015229.

20. Кондакова М.А., Уколова И.В., Боровский Г.Б., Войников В.К. Новые суперкомплексы в системе окислительного фосфорилирования митохондрий проростков гороха *Pisum sativum* L. // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2016. Т. 6. № 3. С. 143–146. DOI: 10.21285/2227-2925-2016-6-3-143-146. EDN: WZQKGF.

21. Rasmusson A.G., Agius S.C. Rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases in plants: immunodetection and distribution of native proteins in mitochondria // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001. Vol. 39, no. 12. P. 1057–1066. DOI: 10.1016/S0981-9428(01)01334-1.

22. Antos-Krzeminska N., Jarmuszkievicz W. Alternative type II NAD(P)H dehydrogenases in the mitochondria of protists and fungi // *Protist*. 2019. Vol. 170, no. 1. P. 21–37. DOI: 10.1016/j.protis.2018.11.001.

REFERENCES

1. Cogliati S., Cabrera-Alarcón J.L., Enriquez J.A. Regulation and functional role of the electron transport chain supercomplexes. *Biochemical Society Transactions*. 2021;49(6):2655–2668. DOI: 10.1042/BST20210460.

2. Kohler A., Barrientos A., Fontanesi F., Ott M. The functional significance of mitochondrial respiratory chain supercomplexes. *EMBO Reports*. 2023;24(11):e57092. DOI: 10.15252/embr.202357092.

3. Kühlbrandt W. Structure and mechanisms of F-type ATP synthases. *Annual Review of Biochemistry*. 2019;88:515–549. DOI: 10.1146/annurev-biochem-013118-110903.

4. Ukolova I.V. The subcompartmented oxphosomic model of the phosphorylating system organization in mitochondria. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(7):778–786. DOI: 10.18699/VJ21.089. EDN: VRUFFV.

5. Møller I.M., Rasmusson A.G., Van Aken O. Plant mitochondria – past, present and future. *The Plant Journal*. 2021;108(4):912–959. DOI: 10.1111/tpj.15495.

6. Rasmusson A.G., Geisler D.A., Møller I.M. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion*. 2008;8(1):47–60. DOI: 10.1016/j.mito.2007.10.004.

7. Sweetman C., Waterman C.D., Rainbird B.M., Smith P.M.C., Jenkins C.D., Day D.A., et al. AtNDB2 is the main external NADH dehydrogenase in mitochondria and is important for tolerance to environmental stress. *Plant Physiology*. 2019;181(2):774–788. DOI: 10.1104/pp.19.00877.

8. Garmash E.V. Signal pathways for regulation of plant alternative oxidase genes' expression. *Fiziologiya rastenii*. 2022;69(1):3–19. (In Russian). DOI: 10.31857/S0015330322010055. EDN: AATESI.

9. Braun H.-P. The Oxidative Phosphorylation system of the mitochondria in plants. *Mitochondrion*. 2020;53:66–75. DOI: 10.1016/j.mito.2020.04.007.

10. Grandier-Vazeille X., Bathany K., Chaignepain S.,

Camougrand N., Manon S., Schmitter J.M. Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochemistry*. 2001;40(33):9758–9769. DOI: 10.1021/bi010277r.

11. Guerrero-Castillo S., Vázquez-Acevedo M., González-Halphen D., Uribe-Carvajal S. In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009;1787(2):75–85. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.10.008.

12. Matus-Ortega M.G., Cárdenas-Monroy C.A., Flores-Herrera O., Mendoza-Hernández G., Miranda M., González-Pedrajo B., et al. New complexes containing the internal alternative NADH dehydrogenase (Ndi1) in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2015;32(10):629–641. DOI: 10.1002/yea.3086.

13. Senkler J., Senkler M., Eubel H., Hildebrandt T., Lengwenus C., Schertl P., et al. The mitochondrial complexome of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 2017;89(6):1079–1092. DOI: 10.1111/tpj.13448.

14. Ukolova I.V., Kondakova M.A., Kondratov I.G., Sidorov A.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. New insights into the organisation of the oxidative phosphorylation system in the example of pea shoot mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*. 2020;1861(11):148264. DOI: 10.1016/j.bbabi.2020.148264.

15. Schägger H. Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods in Cell Biology*. 2001;65:231–244. DOI: 10.1016/S0091-679X(01)65014-3.

16. Wittig I., Braun H.-P., Schägger H. Blue native PAGE. *Nature Protocols*. 2006;1(1):418–428. DOI: 10.1038/nprot.2006.62.

17. Sabar M., Balk J., Leaver C.J. Histochemical staining and quantification of plant mitochondrial respiratory chain complexes using blue-native polyacrylamide gel

electrophoresis. *The Plant Journal*. 2005;44(5):893-901. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02577.x.

18. Svensson A.S., Rasmusson A.G. Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves. *The Plant Journal*. 2001;28(1):73-82. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2001.01128.x.

19. Ukolova I.V., Borovskii G.B. OXPHOS organization and activity in mitochondria of plants with different life strategies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(20):15229. DOI: 10.3390/ijms242015229.

20. Kondakova M.A., Ukolova I.V., Borovskii G.B., Voinikov V.K. New supercomplexes of the oxidative phosphorylation system in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings mitochondria. *Pro-*

ceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2016;6(3):143-146. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2016-6-3-143-146. EDN: WZQKGF.

21. Rasmusson A.G., Agius S.C. Rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases in plants: immunodetection and distribution of native proteins in mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001;39(12):1057-1066. DOI: 10.1016/S0981-9428(01)01334-1.

22. Antos-Krzeminska N., Jarmuszkiewicz W. Alternative type II NAD(P)H dehydrogenases in the mitochondria of protists and fungi. *Protist*. 2019;170(1):21-37. DOI: 10.1016/j.protis.2018.11.001.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Уколова Ирина Владимировна,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ irinastupnikova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9167-9316>

Кондакова Марина Александровна,

к.б.н., ведущий инженер,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
kondakova-marina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3859-9138>

Боровский Геннадий Борисович,

д.б.н., профессор, главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
borovskii@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5089-5311>

Вклад авторов

И.В. Уколова – разработка концепции
исследования, получение и анализ данных,
написание текста статьи.

М.А. Кондакова – получение данных.

Г.Б. Боровский – обсуждение полученных
результатов, редактирование рукописи.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina V. Ukolova,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ irinastupnikova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9167-9316>

Marina A. Kondakova,

Cand. Sci. (Biology), Lead Engineer,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
kondakova-marina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3859-9138>

Gennadii B. Borovskii,

Dr. Sci. (Biology), Professor, Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
borovskii@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5089-5311>

Contribution of the authors

Irina V. Ukolova – research concept development,
data receiving and analysis, preparing the text
of manuscript.

Marina A. Kondakova – data receiving.

Gennadii B. Borovskii – results discussion,
editing the text of manuscript.

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 17.04.2024.
Одобрена после рецензирования 25.05.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

Information about the article

The article was submitted 17.04.2024.
Approved after reviewing 25.05.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.

Научная статья
УДК 547.06+662.765.063.4
EDN:RIHDQY
DOI: 10.21285/achb.934



Синтез 1,3-пропанбис(дитиокарбамата) натрия и исследование его флотационных свойств

Т.Х. Сахабутдинова*, Н.В. Вчисло**, Е.А. Верочкина**,
В.Г. Федосеева**, А.Е. Бурдонов*, И.Б. Розенцвейг***

*Иркутский национальный исследовательский технический университет,
Иркутск, Российская Федерация

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

***Иркутский государственный университет, Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. Разработка и выбор подходящего реагента для эффективной флотации имеет важное значение в процессе обогащения руд. Дитиокарбаматы представляют класс органических соединений, которые широко используются в качестве реагентов-собирателей при флотации руд. В работе проведен аналитический обзор по методам получения данного класса соединений. Зафиксировано, что основным методом получения солей дитиокарбаматов является взаимодействие первичных или вторичных аминов с сероуглеродом (CS_2) в присутствии гидроксида калия или натрия. Основной целью работы являлся синтез 1,3-пропанбис(дитиокарбамата) натрия и исследование его флотационных свойств при обогащении золотосодержащих сульфидных руд. Коллективом авторов был предложен простой и эффективный метод синтеза 1,3-пропанбис(дитиокарбамата) натрия, подтверждено его строение с использованием физико-химических методов (инфракрасная спектроскопия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса 1H , ^{13}C). В результате комплекса исследований было установлено, что совместное использование бутилового ксантогената калия и диалкилдитиофосфата натрия (БТФ-1552) с 1,3-пропанбис(дитиокарбаматом) натрия приводит к повышению эффективности извлечения целевого компонента до 81,63% и увеличению его содержания в концентрате до 7 г/т. Также было показано, что комбинация 1,3-пропанбис(дитиокарбамата) натрия с бутиловым ксантогенатом калия позволяет достичь эффективности извлечения 80,51% и содержания ценного компонента в концентрате до 6,5 г/т при низком содержании золота в хвостах флотации 0,07 г/т. Предложенный метод синтеза и результаты флотационных испытаний золотосодержащей руды представляют интерес для дальнейших исследований в области органического синтеза и практического применения.

Ключевые слова: флотация, флотационные реагенты, дитиокарбаматы, синтез, золото

Для цитирования: Сахабутдинова Т.Х., Вчисло Н.В., Верочкина Е.А., Федосеева В.Г., Бурдонов А.Е., Розенцвейг И.Б. Синтез 1,3-пропанбис(дитиокарбамата) натрия и исследование его флотационных свойств // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 428–435. DOI: 10.21285/achb.934. EDN: RIHDQY.

BRIEF COMMUNICATION

Original article

Synthesis of sodium 1,3-propanebis(dithiocarbamate) and study of its flotation properties

Tatiana Kh. Sakhabutdinova*✉, Nadezhda V. Vchislo**, Ekaterina A. Verochkina**,
Victoria G. Fedoseeva**, Aleksandr E. Burdonov*, Igor B. Rozentsveig****

*Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

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

***Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Development and selection of a suitable reagent for efficient flotation is of great importance for ore beneficiation processes. Dithiocarbamates represent a class of organic compounds that are widely used as reagent-collectors in ore flotation. In this work, we conducted an analytical review of the methods currently used for obtaining this class of compounds and established the main method for obtaining dithiocarbamate salts to be the interaction of primary or secondary amines with carbon disulfide (CS_2) in the presence of potassium or sodium hydroxide. The aim of the reviewed work was to synthesize sodium 1,3-propanebis(dithiocarbamate), as well as to study its flotation properties in the beneficiation of gold-bearing sulfide ores. A simple and effective method for sodium 1,3-propanebis(dithiocarbamate) synthesizing was proposed. Its structure was confirmed using physicochemical methods (infrared spectroscopy, ^1H , ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy). A set of studies found that the combined use of potassium butyl xanthate and sodium dialkyl dithiophosphate (BTF-1552) with sodium 1,3-propanebis(dithiocarbamate) led an increase in the efficiency of extraction of the target component of up to 81.63%, as well as an increase in its content in the concentrate of up to 7 g/t. In addition, the combination of sodium 1,3-propanebis(dithiocarbamate) with potassium butyl xanthate was shown to enable an extraction efficiency of 80.51%, as well as a valuable component content in the concentrate of up to 6.5 g/t with a low gold content in flotation tailings of 0.07 g/t. The proposed synthesis method and the results of flotation tests of gold-bearing ores are of interest for further research in the field of organic synthesis and practical application.

Keywords: flotation, flotation reagents, dithiocarbamates, synthesis, gold

For citation: Sakhabutdinova T.Kh., Vchislo N.V., Verochkina E.A., Fedoseeva V.G., Burdonov A.E., Rozentsveig I.B. Synthesis of sodium 1,3-propanebis(dithiocarbamate) and study of its flotation properties. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):428-435. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.934. EDN: RIHDQY.

ВВЕДЕНИЕ

Дитиокарбаматы представляют собой важный класс органических соединений и широко используются в промышленности и сельском хозяйстве, а также для получения лекарств и материалов [1–7]. Такие производные имеют обширный спектр биологической активности (рис. 1), например, противовирусную (SARS-CoV-2), противоопухолевую, противогрибковую активность и др. [8–15]. Фрагмент молекулы дитиокарбамата входит в состав известного лекарства Disulfiram (Antabuse), а также его метаболита Diethyldithiocarbamate, которые успешно применяют при лечении алкогольной зависимости [16, 17]. Это делает дитиокарбаматы важными прекурсорами при разработке новых лекарственных препаратов и привлекает внимание химиков-органиков.

Основным методом получения солей дитиокарбаматов является взаимодействие первичных или вторичных аминов с сероуглеродом (CS_2) в присутствии гидроксида калия или натрия¹. Известно, что сульф-

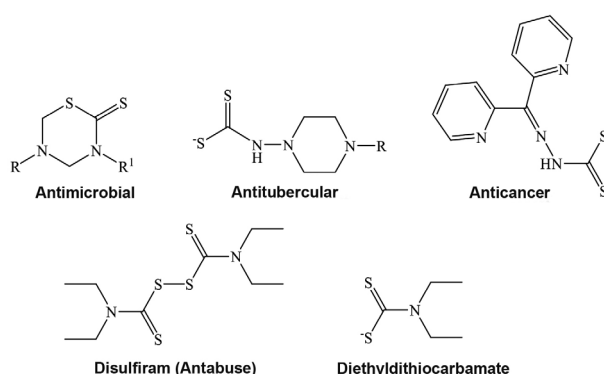


Рис. 1. Схема биологически активных соединений с фрагментом дитиокарбамата

Fig. 1. Scheme of biologically active compounds with a dithiocarbamate fragment

¹ Schubart R. Dithiocarbamic acid and derivatives // Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH, 2000. DOI: 10.1002/14356007.a09_001.

гидрильные фрагменты в составе дитиокарбаматов способствуют флотационному обогащению полезных компонентов сульфидных минералов меди, включая ковеллит, халькопирит и халькоцит [18–20]. Разработка и выбор подходящих реагентов для обрабатываемого материала играют жизненно важную роль для эффективной флотации. В связи с этим поиск новых эффективных флотореагентов является актуальной задачей прикладной органической и элементоорганической химии.

Цель данного исследования состоит в осуществлении простого метода синтеза 1,3-пропанбис(дитиокарбамата) натрия и исследовании его флотационных свойств при обогащении золотосодержащей руды.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Инфракрасный (ИК) спектр записан на спектрометре Bruker IFS 25 (Bruker, Германия) в таблетке KBr. Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ^1H , ^{13}C зарегистрированы на приборе Bruker DPX-400 (400 и 100 МГц соответственно) в растворах DMSO-d_6 , внутренний стандарт TMS. Элементный анализ выполнен на анализаторе Thermo Finnigan Flash series 1112 (Thermo Fisher Scientific, США). 1,3-Диаминопропан (**1**) и сероуглерод являются коммерчески доступными реагентами.

В исследованиях для проведения флотационных экспериментов использовали лабораторную флотомашину ФМЛ-1 («Механобр-техника», Россия). Машина предназначена для изучения обогатимости различных руд методом пенной флотации с содержанием твердых веществ в пульпе до 40% по массе и крупностью 0,074 мм свыше 50% при pH от 2 до 12. Частота вращения импеллера во время экспериментов – 1500 об/мин. По предварительным исследованиям оптимальный объем камеры составляет 1 л.

Общая методика. К 1,3-диаминопропану (0,5 г, 0,0068 моль) в ацетоне прибавляли одной порцией NaOH (0,544 г, 0,0136 моль) и раствор сероуглерода (1,034 г, 0,0136 моль) в ацетоне по каплям. После прибавления сероуглерода реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 2 ч. Постепенно целевой продукт выпадал в виде осадка, после фильтрации и сушки которого не требуется дополнительная очистка. Выход 85%, т.пл. 320 °С. ИК-спектр (KBr), ν , см^{-1} : 3435, 3230, 1497, 1295, 1136, 953. Спектр ЯМР ^1H (DMSO-d_6), δ , м.д.: 1,57 м (2H, CH_2), 3,33 м (4H, NCH_2), 3,5 с (2H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C (DMSO-d_6), δ , м.д.: 28,5 (CH_2), 43,9 (2NCH $_2$), 214,2 (2C=S). Найдено, %: C – 22,19; H – 2,98; N – 10,40; S – 47,43. $\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_4$. Вычислено, %: C – 22,22; H – 2,96; N – 10,37; S – 47,41.

Методика флотационных экспериментов. Подготовленное рудное сырье (навески по 300 г) загружают в литровую камеру, после чего объем доводят водой до установленной отметки на камере флотомашины. Далее включают импеллер и проводят интенсивное перемешивание пульпы в течение 2 мин при частоте вращения около 1500 (25 Гц) об/мин. Флотацию проводили, следуя реагентному режиму, представленному в таблице. Время перемешивания реагентов-собирающих – 3 мин, вспенивателя – 1 мин.

После добавления всех реагентов включается подача воздуха для образования устойчивой пены и запуска пеносъемника. Время флотации в каждом эксперименте установлено равным 10 мин. В результате получали 2 продукта – концентрат и хвосты. Продукты флотации высушивают, взвешивают, а затем направляют в аналитическую лабораторию для определения в них содержания золота. Определение концентрации ценного компонента (Au) проводят с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии.

Основные результаты проведенной работы были получены с использованием оборудования Байкальского аналитического центра коллективного пользования Иркутского института химии им. А. Е. Фаворского СО РАН (г. Иркутск, Россия).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе синтез 1,3-пропанбис(дитиокарбамата) натрия (**2**) осуществляли в среде ацетона при комнатной температуре с выходом 85% (рис. 2). Ранее в литературе был получен 1,3-пропанбис(дитиокарбамат) калия с выходом всего лишь 10% в воде за 15 ч [21]. Нами эта реакция проведена за 2 ч, что значительно ускорило процесс. 1,3-Пропанбис(дитиокарбамат) натрия выделяется из реакционной смеси в виде бежевого кристаллического осадка, который после окончания реакции отфильтровывали, промывали ацетоном и высушивали.

Строение 1,3-пропанбис(дитиокарбамата) натрия доказано данными элементного анализа и методом ЯМР. Так, в спектрах ЯМР ^{13}C (DMSO-d_6) наблюдается появление характерного сигнала углерода S-C=S в районе 214 м.д. Для сравнения, в исходном сероуглероде сигнал C=S имеет химический сдвиг 192 м.д.

Продолжая исследовательские работы с целью построения новых поверхностно-активных веществ, полученное соединение **2** было испытано нами в лаборатории флотации и флотационных реагентов как собиратель при флотации золотосодержащей сульфидной руды (см. таблицу).

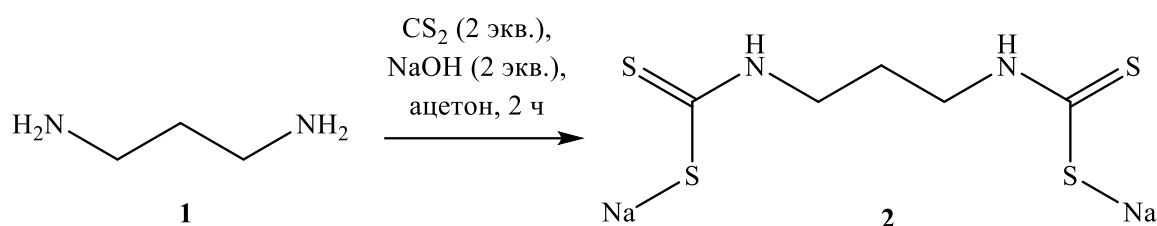


Рис. 2. Схема синтеза 1,3-пропанбис(дитиокарбамата) натрия (**2**)

Fig. 2. Synthesis of sodium 1,3-propanebis(dithiocarbamate) (**2**)

Результаты проведения флотации золотосодержащей сульфидной руды

Results of flotation of gold-bearing sulphide ore

Номер опыта	Продукт	Выход продукта, %	Содержание Au, г/т	Извлечение, %	Используемые реагенты, г/т			
					БКК	БТФ-1552	МИБК	Соединение 2
1	Концентрат	3,5	7,79	80,14	100	65	30	–
	Хвосты	96,5	0,07	19,86				
2	Концентрат	4,26	6,50	80,51	100	–	30	10
	Хвосты	95,74	0,07	19,49				
3	Концентрат	5,17	4,30	70,10	–	65	30	10
	Хвосты	94,83	0,10	29,90				
4	Концентрат	4,26	7,00	81,63	100	65	30	10
	Хвосты	95,74	0,07	18,37				
5	Концентрат	2,13	2,10	14,47	–	–	30	10
	Хвосты	97,87	0,27	85,53				

Примечание. БКК – бутиловый ксантогенат калия (собиратель); БТФ-1552 – диалкилдитиофосфат натрия (собиратель); МИБК – метилизобутиленкарбинол (пенообразователь).

Флотационные испытания с применением метилизобутиленкарбинола в качестве пенообразователя, собирателей бутилового ксантогената калия и диалкилдитиофосфата натрия (БТФ-1552), а также синтезированного нового реагента **2** проведены в лабораторных условиях на золотосодержащей руде с содержанием золота 0,33 г/т. Исходная навеска руды для каждого опыта составила 300 г. Процесс получения золотосодержащего концентрата включал приготовление растворов всех реагентов, измельчение руды до крупности Р80% – 0,074 мм и пенную флотацию.

В результате флотационных экспериментов установлено, что в базовом режиме с применением пенообразователя метилизобутиленкарбинола, смеси собирателей (бутилового ксантогената калия и диалкилдитиофосфата натрия БТФ-1552) извлечение золота в концентрат с содержанием 7,79 г/т составляет 80,14% (опыт 1). При замене одного из базовых собирателей на новый реагент **2** (опыты 2, 3) извлечение золота составляет 80,51 и 70,10% соответственно. Совместное использование стандартных собирателей с дитиокарбаматом **2** увеличило показатель извлечения до 81,63% и повысило содержание ценного компонента в концентрате до 7 г/т (опыт 4). В описанных выше опытах следует обратить внимание на низкое содержание золота в хвостах флотации.

Использование дитиокарбамата **2** в качестве единственного собирателя (опыт 5) снижает процент извлечения золота (14,47%) и его содержание в концентрате (2,13%), что делает данный режим менее эффективным в сравнении с описанными выше вариантами. Можно

утверждать, что применение полученного соединения в качестве самостоятельного реагента-собираателя является экономически нецелесообразным.

Таким образом, наилучшие показатели обогащения достигнуты при совместном использовании реагента **2** с бутиловым ксантогенатом калия и диалкилдитиофосфатом натрия (БТФ-1552) (опыт 4), а также при совместном использовании реагента **2** с бутиловым ксантогенатом калия (опыт 2). Эти данные показывают, что собирательная способность дитиокарбамата **2** является эффективной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предложен простой и легкодоступный метод синтеза 1,3-пропанбис(дитиокарбамата) натрия, приведены доказательства строения с помощью физико-химических методов (ИК спектроскопия, спектроскопия ЯМР ^1H , ^{13}C), а также показаны результаты испытания 1,3-пропанбис(дитиокарбамата) натрия в качестве собирателя при флотации золотосодержащей руды. Получены хорошие результаты, способствующие повышению извлечения золота в коллективный концентрат. 1,3-Пропанбис(дитиокарбамат) натрия и его аналоги представляют собой интересные объекты для дальнейшей работы в области органического синтеза и практического применения. Предполагается проведение комплекса исследований по закреплению композиции собирателей на минеральной поверхности сульфидных минералов и установление механизма взаимодействия.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ajiboye T.O., Ajiboye T.T., Marzouki R., Onwudiwe D.C. The versatility in the applications of dithiocarbamates // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23, no. 3. P. 1317. DOI: 10.3390/ijms23031317.
2. Kaul L., Süß R., Zannettino A., Richter K. The revival of dithiocarbamates: from pesticides to innovative medical treatments // iScience. 2021. Vol. 24, no. 2. P. 102092. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102092.
3. Viola-Rhenals M., Patel K.R., Jaimes-Santamaria L., Wu G., Liu J., Dou Q.P. Recent advances in Antabuse (Disulfiram): the importance of its metal-binding ability to its

anticancer activity // Current Medicinal Chemistry. 2018. Vol. 25, no. 5. P. 506–524. DOI: 10.2174/0929867324666171023161121.

4. Kurian J.K., Peethambaran N.R., Mary K.C., Kuriakose B. Effect of vulcanization systems and antioxidants on discoloration and degradation of natural rubber latex thread under UV radiation // Journal of Applied Polymer Science. 2000. Vol. 78, no. 2. P. 304–310. DOI: 10.1002/1097-4628(20001010)78:2<304::AID-APP100>3.0.CO;2-G.

5. Cvek B., Dvorak Z. Targeting of nuclear factor- κ B and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals // *Current Pharmaceutical Design*. 2007. Vol. 13, no. 30. P. 3155–3167. DOI: 10.2174/138161207782110390.

6. Бурдонов А.Е., Вчисло Н.В., Верочкина Е.А., Розенцвейг И.Б. Синтез новых производных ксантогенатов и дитиокарбаматов и их применение в процессах обогащения // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2023. Т. 13. N 2. С. 160–171. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-2-160-171. EDN: PNMZLC.

7. Campanale C., Triozzi M., Ragonese A., Losacco D., Massarelli C. Dithiocarbamates: properties, methodological approaches and challenges to their control // *Toxics*. 2023. Vol. 11, no. 10. P. 851. DOI: 10.3390/toxics11100851.

8. Bala V., Gupta G., Sharma V.L. Chemical and medicinal versatility of dithiocarbamates: an overview // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2014. Vol. 14, no. 14. P. 1021–1032. DOI: 10.2174/1389557514666141106130146.

9. Duan Y.-C., Zheng Y.-C., Li X.-C., Wang M.-M., Ye X.-W., Guan Y.-Y., et al. Design, synthesis and antiproliferative activity studies of novel 1,2,3-triazole–dithiocarbamate–urea hybrids // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013. Vol. 64. P. 99–110. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.03.058.

10. Sheef A.F. A method for maintaining *Phytophthora* in culture to long periods without transfer // *Phytopathology*. 1943. Vol. 33, no. 4. P. 300–332.

11. He X.-Y., Lu L., Qiu J., Zou P., Yu F., Jiang X.-K., et al. Small molecule fusion inhibitors: Design, synthesis and biological evaluation of (Z)-3-(5-(3-benzyl-4-oxo-2-thioxothiazolidinylidene)methyl)-N-(3-carboxy-4-hydroxy)phenyl-2,5-dimethylpyrroles and related derivatives targeting HIV-1 gp41 // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2013. Vol. 21, no. 23. P. 7539–7548. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.04.046.

12. Harrison J.J., Turner R.J., Ceri H. A subpopulation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilm cells are highly tolerant to chelating agents // *FEMS Microbiology Letters*. 2007. Vol. 272, no. 2. P. 172–181. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00745.x.

13. Xu L., Tong J., Wu Y., Zhao S., Lin B.-L. A computational evaluation of targeted oxidation strategy (TOS) for potential inhibition of SARS-CoV-2 by disulfiram and

analogues // *Biophysical Chemistry*. 2021. Vol. 276. P. 106610. DOI: 10.1016/j.bpc.2021.106610.

14. Karimov A., Taslimi P., Orujova A., Mammadova K., Kisa D., Farzaliyev V., et al. Design, synthesis, characterization and biological activities of novel S-(acyloxy)butyl-N,N-diethyldithiocarbamate compounds // *Chemistry-Select*. 2023. Vol. 8, no. 18. P. e202300286. DOI: 10.1002/slct.202300286.

15. Trawally M., Demir-Yazıcı K., Dingiş-Birgöl S.İ., Kaya K., Akdemir A., Güzel-Akdemir Ö. Dithiocarbamates and dithiocarbonates containing 6-nitrosaccharin scaffold: Synthesis, antimycobacterial activity and *in silico* target prediction using ensemble docking-based reverse virtual screening // *Journal of Molecular Structure*. 2023. Vol. 1277. P. 134818. DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.134818.

16. Soyka M., Roesner S. New pharmacological approaches for the treatment of alcoholism // *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2006. Vol. 7, no. 17. P. 2341–2353. DOI: 10.1517/14656566.7.17.2341.

17. Singh A.N., Srivastava S., Jainar A.K. Pharmacotherapy of chronic alcoholism: a review // *Drugs of Today*. 1999. Vol. 35, no. 1. P. 27–33. DOI: 10.1358/dot.1999.35.1.522944.

18. Ma X., Hu Y., Zhong H., Wang S., Liu G., Zhao G. A novel surfactant S-benzoyl-N,N-diethyldithiocarbamate synthesis and its flotation performance to galena // *Applied Surface Science*. 2016. Vol. 365. P. 342–351. DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.01.048.

19. Liu S., Liu G., Zhong H., Yang X. The role of HABTC's hydroxamate and dithiocarbamate groups in chalcopryrite flotation // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2017. Vol. 52. P. 359–368. DOI: 10.1016/j.jiec.2017.04.015.

20. Liu S., Dong Y., Xie L., Liu G., Zhong H., Zeng H. Uncovering the hydrophobic mechanism of a novel dithiocarbamate-hydroxamate surfactant towards galena // *Chemical Engineering Science*. 2021. Vol. 245. P. 116765. DOI: 10.1016/j.ces.2021.116765.

21. Katritzky A.R., Tarr R.D., Heilmann S.M., Ras-mussen J.K., Krepski L.R. Synthesis and characterization of poly([3H]-thiazole-2-thione)s // *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. 1987. Vol. 25, no. 12. P. 3205–3214. DOI: 10.1002/pola.1987.080251203.

REFERENCES

1. Ajiboye T.O., Ajiboye T.T., Marzouki R., Onwudiwe D.C. The versatility in the applications of dithiocarbamates. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(3):1317. DOI: 10.3390/ijms23031317.

2. Kaul L., Süß R., Zannettino A., Richter K. The revival of dithiocarbamates: from pesticides to innovative medical treatments. *iScience*. 2021;24(2):102092. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102092.

3. Viola-Rhenals M., Patel K.R., Jaimes-Santamaria L., Wu G., Liu J., Dou Q.P. Recent advances in Antabuse (Disulfiram): the importance of its metal-binding ability to its anticancer activity. *Current Medicinal Chemistry*. 2018;25(5):506–524. DOI: 10.2174/0929867324666171023161121.

4. Kurian J.K., Peethambaran N.R., Mary K.C., Kuriakose B. Effect of vulcanization systems and antioxidants on discoloration and degradation of natural rubber latex thread under UV radiation. *Journal of Applied Polymer Science*. 2000;78(2):304–310.

DOI: 10.1002/1097-4628(20001010)78:2<304::AID-APP100>3.0.CO;2-G.

5. Cvek B., Dvorak Z. Targeting of nuclear factor- κ B and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals. *Current Pharmaceutical Design*. 2007;13(30):3155–3167. DOI: 10.2174/138161207782110390.

6. Burdonov A.E., Vchislo N.V., Verochkina E.A., Rozentsveig I.B. Synthesis of new dithiocarbamate and xanthate complexes and their application in enrichment processes. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(2):160–171. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-2-160-171. EDN: PNMZLC.

7. Campanale C., Triozzi M., Ragonese A., Losacco D., Massarelli C. Dithiocarbamates: properties, methodological approaches and challenges to their control. *Toxics*. 2023;11(10):851. DOI: 10.3390/toxics11100851.

8. Bala V., Gupta G., Sharma V.L. Chemical and medicinal versatility of dithiocarbamates: an overview. *Mini-*

Reviews in Medicinal Chemistry. 2014;14(14):1021-1032. DOI: 10.2174/1389557514666141106130146.

9. Duan Y.-C., Zheng Y.-C., Li X.-C., Wang M.-M., Ye X.-W., Guan Y.-Y., et al. Design, synthesis and antiproliferative activity studies of novel 1,2,3-triazole–dithiocarbamate–urea hybrids. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;64:99-110. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.03.058.

10. Sheef A.F. A method for maintaining *Phytopomonas sepedonica* in culture to long periods without transfer. *Phytopathology*. 1943;33(4):300-332.

11. He X.-Y., Lu L., Qiu J., Zou P., Yu F., Jiang X.-K., et al. Small molecule fusion inhibitors: Design, synthesis and biological evaluation of (Z)-3-(5-(3-benzyl-4-oxo-2-thioxothiazolidinylidene)methyl)-N-(3-carboxy-4-hydroxy)phenyl-2,5-dimethylpyrroles and related derivatives targeting HIV-1 gp41. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2013;21(23):7539-7548. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.04.046.

12. Harrison J.J., Turner R.J., Ceri H. A subpopulation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* biofilm cells are highly tolerant to chelating agents. *FEMS Microbiology Letters*. 2007;272(2):172-181. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00745.x.

13. Xu L., Tong J., Wu Y., Zhao S., Lin B.-L. A computational evaluation of targeted oxidation strategy (TOS) for potential inhibition of SARS-CoV-2 by disulfiram and analogues. *Biophysical Chemistry*. 2021;276:106610. DOI: 10.1016/j.bpc.2021.106610.

14. Karimov A., Taslimi P., Orujova A., Mammadova K., Kisa D., Farzaliyev V., et al. Design, synthesis, characterization and biological activities of novel S-(acyloxy)butyl-N,N-diethyldithiocarbamate compounds. *ChemistrySelect*. 2023;8(18):e202300286. DOI: 10.1002/slct.202300286.

15. Trawally M., Demir-Yazıcı K., Dingiş-Birgül S.İ., Kaya K., Akdemir A., Güzel-Akdemir Ö. Dithiocarbamates

and dithiocarbonates containing 6-nitrosaccharin scaffold: Synthesis, antimycobacterial activity and *in silico* target prediction using ensemble docking-based reverse virtual screening. *Journal of Molecular Structure*. 2023;1277:134818. DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.134818.

16. Soyka M., Roesner S. New pharmacological approaches for the treatment of alcoholism. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2006;7(17):2341-2353. DOI: 10.1517/14656566.7.17.2341.

17. Singh A.N., Srivastava S., Jainar A.K. Pharmacotherapy of chronic alcoholism: a review. *Drugs of Today*. 1999;35(1):27-33. DOI: 10.1358/dot.1999.35.1.522944.

18. Ma X., Hu Y., Zhong H., Wang S., Liu G., Zhao G. A novel surfactant S-benzoyl-N,N-diethyldithiocarbamate synthesis and its flotation performance to galena. *Applied Surface Science*. 2016;365:342-351. DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.01.048.

19. Liu S., Liu G., Zhong H., Yang X. The role of HABTC's hydroxamate and dithiocarbamate groups in chalcopryrite flotation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2017;52:359-368. DOI: 10.1016/j.jiec.2017.04.015.

20. Liu S., Dong Y., Xie L., Liu G., Zhong H., Zeng H. Uncovering the hydrophobic mechanism of a novel dithiocarbamate-hydroxamate surfactant towards galena. *Chemical Engineering Science*. 2021;245:116765. DOI: 10.1016/j.ces.2021.116765.

21. Katritzky A.R., Tarr R.D., Heilmann S.M., Rasmussen J.K., Krepski L.R. Synthesis and characterization of poly([3H]-thiazole-2-thione)s. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. 1987;25(12):3205-3214. DOI: 10.1002/pola.1987.080251203.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Сахабутдинова Татьяна Хамитовна,
инженер-исследователь,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ statyana411@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0003-3872-0572>

Вчисло Надежда Викторовна,
к.х.н., научный сотрудник,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
vchislo@irioc.irk.ru
<http://orcid.org/0000-0002-1921-0257>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Tatiana Kh. Sakhabutdinova,
Research Engineer,
Irkutsk National Research
Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ statyana411@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0003-3872-0572>

Nadezhda V. Vchislo,
Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
vchislo@irioc.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1921-0257>

Верочкина Екатерина Александровна,
к.х.н., научный сотрудник,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
kleptsova84@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4907-5612>

Федосеева Виктория Германовна,
научный сотрудник,
Иркутский институт химии им.
А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
vic_yol@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5293-5316>

Бурдонов Александр Евгеньевич,
к.т.н., доцент, доцент,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
burdonovae@ex.istu.edu
<https://orcid.org/0000-0002-5356-0349>

Розенцвейг Игорь Борисович,
д.х.н., доцент,
заведующий лабораторией,
заместитель директора по научной работе,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
профессор,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
i_roz@irioch.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7817-7816>

Вклад авторов

Т.Х. Сахабутдинова – проведение экспериментов, обработка полученных данных, осуществление расчетов, написание текста статьи.
Н.В. Вчисло – проведение экспериментов, написание текста статьи, обработка полученных данных, работа с литературой.
Е.А. Верочкина – проведение экспериментов, работа с литературой.
В.Г. Федосеева – проведение экспериментов, работа с литературой.
А.Е. Бурдонов – разработка концепции исследования, написание текста статьи, анализ и обобщение результатов исследования.
И.Б. Розенцвейг – разработка концепции исследования.

Ekaterina A. Verochkina,
Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
kleptsova84@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4907-5612>

Victoria G. Fedoseeva,
Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation
vic_yol@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5293-5316>

Aleksandr E. Burdonov,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Associate Professor,
Irkutsk National Research
Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
burdonovae@ex.istu.edu
<https://orcid.org/0000-0002-5356-0349>

Igor B. Rozentsveig,
Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Head of the Laboratory,
Deputy Director for Research,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
Professor,
Irkutsk State University
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
i_roz@irioch.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7817-7816>

Contribution of the authors

Tatiana Kh. Sakhabutdinova – conducting experiments, data processing, calculations, writing the text of manuscript.
Nadezhda V. Vchislo – conducting experiments, writing the text of manuscript, data processing, literature review.
Ekaterina A. Verochkina – conducting experiments, literature review.
Victoria G. Fedoseeva – conducting experiments, literature review.
Aleksandr E. Burdonov – research concept development, writing the text of manuscript, results analysis and generalization.
Igor B. Rozentsveig – research concept development.

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 01.08.2024.
Одобрена после рецензирования 27.08.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

Information about the article

The article was submitted 01.08.2024.
Approved after reviewing 27.08.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.

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), ВИНТИ 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 14 N 3 (50) 2024

12+

**PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
APPLIED CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

Volume 14 No. 3 (50) 2024

Редактор Ф.А. Посысоева

Перевод на английский язык:

А.А. Семянникова, Н.Г. Попова, David Mossor (PhD), Е.А. Привалова

Верстка Т.С. Жевлакова

Дата выхода в свет 30.09.2024. Формат 60 x 90 / 8.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 17,75
Тираж 500 экз. Зак. 57. Поз. плана 5н.

Отпечатано в типографии издательства
ФГБОУ ВО «ИРНИТУ»

Адрес типографии:

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

Издание распространяется бесплатно
ФГБОУ ВО «ИРНИТУ»,
Россия, 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83