

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

12+

Том 14 N 4

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 4 (51) 2024



ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского
технического университета



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
ПРИКЛАДНАЯ ХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ
Том 14 N 4 (51) 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 Кореи), (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. 4 (51) 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

- Ковтунец Е.В., Спиридонова Т.С., Тушинова Ю.А., Логвинова А.В., Базарова Ц.Т., Базаров Б.Г. Термическое расширение и ионная проводимость $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$ 444
- Борисова Ю.Г., Булгаков А.К., Хуснутдинова Н.С., Раскильдина Г.З., Злотский С.С., Булгакова А.А., Мещерякова С.А., Султанова Р.М. Синтез и антимикробная активность функционально замещенных 1,3-диоксациклоалканов..... 453

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

- Дунг Н.Т., Сон Ф.Х., Тринь Н.Т.Н., Тхао В.Н.Т., Ту Б.Л.К., Луан Л.К., Тхинь Б.Б., Хай Л.В. Оценка противогрибковой и антиоксидантной активности экстрактов, полученных из дождевого червя (*Perionyx excavatus*) с использованием различных растворителей..... 462
- Тюрина Т.Г., Крюк Т.В., Шевчук Н.О. Полимерные конъюгаты цефотаксима и кинетика его высвобождения..... 472
- Алиева Ш.Р., Кодирова Г.А., Шерова З.У., Усманова С.Р., Мухидинов З.К. Эмульсионные микро- и нанокапсулы в системе концентрат лактоглобулина / пектин с эфирным маслом лаванды *Lavandula angustifolia*, стабилизированные ультразвуком..... 482
- Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Рост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtrXTH1* в условиях абиотического стресса..... 495
- Шавыркина Н.А., Гладышева Е.К., Зенкова А.А., Скиба Е.А. Биотехнологическая трансформация биомассы мискантуса гигантского в бактериальную наноцеллюлозу..... 504
- Боровский Г.Б., Горбылева Е.Л., Катышев А.И., Коротаева Н.Е., Полякова Е.А., Пятрикас Д.В., Степанов А.В., Федосеева И.В., Шигарова А.М. Влияние повышенной экспрессии гена митохондриальной альтернативной внешней NADH-дегидрогеназы *Arabidopsis thaliana* на уровень генерации активных форм кислорода в листьях табака *Nicotiana tabacum* при низкой температуре..... 514
- Ертилецкая Н.Л., Суханова А.А., Бояндин А.Н., Середя А.А., Сырцов С.Н., Прокопчук Ю.А. Исследование продуктивности и свойств штамма *Weizmannia coagulans*, способного синтезировать L-молочную кислоту..... 525
- Клементьев С.В., Буденкова Е.А., Куликова Ю.В., Сироткин А.С. Использование водной фазы процесса гидротермального оживления как субстрата для культивирования микроводорослей..... 537
- Коваленко С.А., Купчинский А.Б., Стом Д.И. Динамика концентрации нафталина в водной среде в присутствии *Bacillus megaterium*..... 548
- Семеньева Л.Л., Продаевич В.В., Румянцева В.О., Фукина Д.Г., Корягин А.В., Валетова Н.Б., Смирнова О.Н., Сулейманов Е.В. Синтез трехмерных матриц на основе привитых сополимеров коллаген-пектин-полиакрилат с использованием фотокатализа в присутствии сложного оксида $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ 556
- Крыжко А.В. Частота встречаемости cgy-подобных генов в штаммах *Bacillus thuringiensis* Крымской коллекции микроорганизмов..... 567
- Мориц А.С., Маркова Ю.А., Филинова Н.В., Петрушин И.С. Влияние биостимулятора *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D на бактерии, выделенные из эндо- и ризосферы растений картофеля..... 578
- Пивненко Т.Н., Позднякова Ю.М., Панчишина Е.М., Есипенко Р.В. Влияние метода су-вид и ферментативной реструктуризации мышечной ткани макруруса малоглазого на формирование качества готовой продукции..... 586
- Петухова О.С., Приставка А.А., Приставка Е.А., Гавриков Д.Е., Саловарова В.П. Сравнительный анализ структурно-функциональных особенностей эндоглюканаз с разным температурным оптимумом действия..... 596

CONTENTS

CHEMICAL SCIENCES

- Kovtunets E.V., Spiridonova T.S., Tushinova Yu.L., Logvinova A.V., Bazarova T.T., Bazarov B.G.** Thermal expansion and ionic conductivity of $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$ **444**
- Borisova Yu.G., Bulgakov A.K., Khusnutdinova N.S., Raskildina G.Z., Zlotsky S.S., Bulgakova A.A., Meshcheryakova S.A., Sultanova R.M.** Synthesis and antimicrobial activity of functionally substituted 1,3-dioxacycloalkanes..... **453**

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

- Dung N.T., Son P.H., Trinh N.T.N., Thao V.N.T., Tu B.L.K., Luan L.Q., Thinh B.B., Hai L.V.** Evaluation of antifungal and antioxidant activities of extracts prepared from earthworm (*Perionyx excavatus*) using different solvents..... **462**
- Tyurina T.G., Kryuk T.V., Shevchuk N.O.** Polymeric conjugates of cefotaxime and its release kinetics..... **472**
- Alieva Sh.R., Qodirova G.A., Sherova Z.U., Usmanova S.R., Muhidinov Z.K.** Emulsion micro- and nanocapsules of the lactoglobulin concentrate / pectin system with essential oil of *Lavandula angustifolia* stabilized by ultrasound..... **482**
- Berezhneva Z.A., Musin K.G., Kuluev B.R.** Root growth in transgenic tobacco plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene encoding xyloglucan endotransglycosylase under abiotic stress..... **495**
- Shavyrkina N.A., Gladysheva E.K., Zenkova A.A., Skiba E.A.** Biotechnological transformation of giant miscanthus biomass into bacterial nanocellulose..... **504**
- Borovskii G.B., Gorbyleva E.L., Katyshev A.I., Korotaeva N.E., Polyakova E.A., Pyatrikas D.V., Stepanov A.V., Fedoseeva I.V., Shigarova A.M.** Effect of increased gene expression of alternative external NADH dehydrogenase of mitochondria of *Arabidopsis thaliana* on the generation of reactive oxygen in *Nicotiana tabacum* tobacco leaves at low temperatures..... **514**
- Ertiletskaya N.L., Sukhanova A.A., Boyandin A.N., Sereda A.A., Syrtsov S.N., Prokopchuk Yu.A.** Productivity and properties of a *Weizmannia coagulans* strain capable of synthesizing L-lactic acid..... **525**
- Klementev S.V., Budenkova E.A., Kulikova Yu.V., Sirotkin A.S.** Utilization of the aqueous phase of the hydrothermal liquefaction process as a substrate for microalgae cultivation..... **537**
- Kovalenko S.A., Kupchinsky A.B., Stom D.I.** Naphthalene concentration dynamics in an aqueous medium in the presence of *Bacillus megaterium*..... **548**
- Semenycheva L.L., Prodaevich V.V., Rumyantseva V.O., Fukina D.G., Koryagin A.V., Valetova N.B., Smirnova O.N., Suleimanov E.V.** Synthesis of three-dimensional matrices based on collagen-pectin-polyacrylate grafted copolymers using the $RbTe_{1.5}W_{0.5}O_6$ photocatalyst..... **556**
- Kryzhko A.V.** Frequency of cry-like genes in *Bacillus thuringiensis* strains of the Crimean microorganism collection..... **567**
- Morits A.S., Markova Yu.A., Filinova N.V., Petrushin I.S.** Influence of *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D biostimulator on bacterial isolates from potato endo- and rhizosphere..... **578**
- Pivnenko T.N., Pozdnyakova J.M., Panchishina E.M., Esipenko R.V.** Effect of the sous-vide method and enzymatic rearrangement of giant grenadier muscle tissue on the quality of finished products..... **586**
- Petukhova O.S., Pristavka A.A., Pristavka E.A., Gavrikov D.E., Salovarova V.P.** Comparative analysis of the structural and functional features of endoglucanases with different temperature optima..... **596**



Термическое расширение и ионная проводимость

$K_5Pb_{0,5}Zr_{1,5}(MoO_4)_6$

Е.В. Ковтунец✉, Т.С. Спиридонова, Ю.Л. Тушинова,
А.В. Логвинова, Ц.Т. Базарова, Б.Г. Базаров

Байкальский институт природопользования СО РАН, Улан-Удэ, Российская Федерация

Аннотация. Целью представленного исследования являлось получение нового тройного молибдата $K_5Pb_{0,5}Zr_{1,5}(MoO_4)_6$, изоструктурного $K_5Pb_{0,5}Hf_{1,5}(MoO_4)_6$, методом направленного синтеза по твердофазной реакции в интервале температур от 350 до 550 °С в течение 100 ч. Соединение кристаллизуется в тригональной сингонии с пространственной группой $R\bar{3}$ с параметрами элементарной ячейки $a = 10,6604(2) \text{ \AA}$, $c = 37,9769(9) \text{ \AA}$, $V = 3737,6(2) \text{ \AA}^3$. Структура уточнена методом Ритвельда. Положения атомов уточнены в изотропном приближении с «мягкими» ограничениями на расстояния Mo–O и углы связей O–Mo–O. Кристаллическая структура представляет собой трехмерный каркас, образующийся из октаэдров PbO_6 и ZrO_6 и тетраэдров MoO_4 , соединяющихся между собой посредством общих кислородных вершин. Термическое расширение $K_5Pb_{0,5}Zr_{1,5}(MoO_4)_6$ исследовано методом высокотемпературной порошковой рентгенографии. Вычисленные значения коэффициентов термического расширения вдоль обеих кристаллографических осей остаются положительными во всем температурном диапазоне, при этом значение α_x остается постоянным, в то время как значение α_c с ростом температуры возрастает. Полученный тройной молибдат относится к материалам с высоким тепловым расширением ($\alpha_v = 60 \times 10^{-6} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$). Значительная анизотропия в кристаллографическом направлении обусловлена «мягкими» легко деформируемыми связями K–O и Pb–O. Электропроводность $K_5Pb_{0,5}Zr_{1,5}(MoO_4)_6$ исследована методом импедансной спектроскопии в интервале температур 30–500 °С; при 500 °С значение проводимости достигает $0,7 \times 10^{-4} \text{ См/см}$ с $E_a = 0,59 \text{ эВ}$.

Ключевые слова: тройной молибдат, твердофазный синтез, структура, термическое расширение, проводимость, высокотемпературная рентгенография

Благодарности. Рентгенофазовый анализ, высокотемпературная рентгенография и измерения электропроводности выполнены с использованием ресурсов Центра коллективного пользования исследовательского оборудования Байкальского института природопользования СО РАН (г. Улан-Удэ).

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 23-29-00327).

Для цитирования: Ковтунец Е.В., Спиридонова Т.С., Тушинова Ю.Л., Логвинова А.В., Базарова Ц.Т., Базаров Б.Г. Термическое расширение и ионная проводимость $K_5Pb_{0,5}Zr_{1,5}(MoO_4)_6$ // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 444–452. DOI: 10.21285/achb.939. EDN: GWYOKH.

Thermal expansion and ionic conductivity of $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$

Evgeniy V. Kovtunets✉, Tatyana S. Spiridonova, Yunna L. Tushinova,
Alexandra V. Logvinova, Tsyrendyshit T. Bazarova, Bair G. Bazarov

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

Abstract. The present study is aimed at the directed synthesis of a new ternary molybdate $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$ isostructural to $K_5Pb_{0.5}Hf_{1.5}(MoO_4)_6$ by solid-phase reaction within the temperature range of 350–550 °C (for 100 h). The compound crystallizes in the rhombohedral system with the space group $R\bar{3}$ and unit cell parameters of $a = 10.6604(2)$ Å, $c = 37.9769(9)$ Å, and $V = 3737.6(2)$ Å³. The structure was refined using the Rietveld method. The atomic positions were refined in the isotropic approximation, with soft constraints on Mo–O distances and O–Mo–O bond angles. The crystal structure constitutes a 3D scaffold comprising PbO_6 and ZrO_6 octahedrons and MoO_4 tetrahedrons sharing oxygen vertices. The thermal expansion of $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$ was studied via high-temperature X-ray powder diffraction. The calculated thermal expansion coefficients along both crystallographic axes remain positive over the entire temperature range. In this case, the value of α_a remains constant, while that of α_c increases with rising temperature. The obtained ternary molybdate belongs to materials with high thermal expansion ($\alpha_v = 60 \times 10^{-6}$ °C⁻¹). The significant anisotropy in the crystallographic direction c can be attributed to the soft K–O and Pb–O bonds. The electrical conductivity of $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$ was studied via impedance spectroscopy within the temperature range of 30–500 °C; at 500 °C, the conductivity amounted to 0.7×10^{-4} S/cm, with $E_a = 0.59$ eV.

Keywords: ternary molybdate, solid-phase synthesis, structure, thermal expansion, conductivity, high-temperature X-ray diffraction

Acknowledgements. X-ray phase analysis, high-temperature radiography and electrical conductivity measurements were performed using the resources of the Center for Collective Use of Research Equipment of the Baikal Institute of Nature Management SB RAS (Ulan-Ude).

Funding. The Russian Science Foundation supported this work (grant 23-29-00327).

For citation: Kovtunets E.V., Spiridonova T.S., Tushinova Yu.L., Logvinova A.V., Bazarova T.T., Bazarov B.G. Thermal expansion and ionic conductivity of $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):444–452. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.939. EDN: GWYOKH.

ВВЕДЕНИЕ

Тройные молибдаты, в составе которых имеется три катиона и тетраэдрический анион, относятся к неорганическому классу сложноокисных соединений с уникальными физико-химическими характеристиками. Благодаря широким возможностям варьирования катионного состава и каркасному строению сложные молибдаты обладают уникальными термическими [1–4], ионопроводящими [5–9], люминесцентными [10–16] и другими важными свойствами [17–21].

Ранее были исследованы системы K_2MoO_4 – $AMoO_4$ – $Hf(MoO_4)_2$ ($A = Ca, Sr, Ba, Pb$) в субсолидусной области. Системы характеризуются образованием тройных молибдатов состава $K_5A_{0.5}Hf_{1.5}(MoO_4)_6$ [22].

В данной работе методом направленного синтеза (изокатионное замещение) получен новый член семейства тройных молибдатов $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$. Проведена первичная характеристика. Методом Ритвельда уточнена кристаллическая структура. Изучены ионопроводящие свойства, и впервые для семейства $K_5M^{II}_{0.5}M^{IV}_{1.5}(MoO_4)_6$ ($M^{II} = Ca, Sr, Ba, Pb$; $M^{IV} = Zr, Hf$) на примере данной фазы рассчитаны коэффициенты термического расширения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Твердофазный синтез. Для получения тройного молибдата $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$ методом твердофазных реакций использовали в качестве исходных компонентов K_2MoO_4 (х.ч.), $PbMoO_4$ (ос.ч.) и предварительно синтезированный $Zr(MoO_4)_2$. $Zr(MoO_4)_2$ получали по реакции ZrO_2 (ос.ч.) + $2MoO_3$ (х.ч.) = $Zr(MoO_4)_2$. Подготовленную смесь оксидов отжигали в муфельной печи ступенчато в интервале температур 450–750 °C (50–60 ч). Тройной молибдат $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$ был получен ступенчатым отжигом исходной смеси простых молибдатов в интервале температур 350–550 °C в течение 100 ч. В процессе синтеза образец неоднократно перетирали в среде этилового спирта. Фазовая чистота полученных соединений была подтверждена методом порошковой рентгеновской дифракции.

Уточнение структуры и термическое расширение. Массив экспериментальных рентгенографических данных синтезированного образца получен на порошковом дифрактометре Bruker AXS D8 Advance (Bruker, Германия, детектор Vantec-1) с использованием геометрии Брэгга – Брентано и излучением $CuK_{\alpha 1,2}$. Измерения

проводились в условиях окружающей среды с шагом 0,02079° и временем сбора данных 15 с/шаг. Терморентгеновское исследование проводили в вакууме с использованием высокотемпературной камеры НТК16 (Anton Paar, Австрия). Образец готовили на платиновой подложке из спиртовой суспензии и исследовали в диапазоне 30–500 °С при средней скорости нагревания 50 °С/ч, интервал углов дифракции составлял 5–60°, скорость съемки – 3 с/шаг. Обработку экспериментальных данных и уточнение кристаллической структуры полученного соединения выполняли методом Ритвельда с использованием подхода фундаментальных параметров в программе TOPAS 4.2 [23]. Визуализация и расчет коэффициентов термического расширения выполнялись с помощью пакета программ ТТТ [24]. Температурная зависимость параметров элементарной ячейки аппроксимировалась полиномами первой и второй степени. По полученным данным были рассчитаны коэффициенты термического расширения и построены сечения фигуры коэффициентов теплового расширения.

Измерение электропроводности. Измерение электропроводности проводили в интервале температур 200–500 °С с помощью импедансметра Z-1500J («Элинс», Россия) в режимах нагревания и охлаждения (2°/мин) в диапазоне частот 1 Гц – 1 МГц. Керамические диски $K_5Pb_{0,5}Zr_{1,5}(MoO_4)_6$ для изучения ионопроводящих свойств были приготовлены прессованием порошка при 1 кбар и спеканием при 500 °С в течение 4 ч. Диски имели диаметр 9,1 мм и толщину 1 мм. Путем вжигания в течение 1 ч коллоидной платины на поверхность керамических дисков были нанесены электроды.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Уточнение и описание кристаллической структуры $K_5Pb_{0,5}Zr_{1,5}(MoO_4)_6$. Все пики, кроме небольших примесных пиков в соединении $K_5Pb_{0,5}Zr_{1,5}(MoO_4)_6$, были проиндексированы в тригональной ячейке (пространственная группа $R\bar{3}$) с параметрами, близкими к $K_5Pb_{0,5}Hf_{1,5}(MoO_4)_6$

[25], чьи параметры элементарной ячейки и положения атомов использовались в качестве стартовой модели для уточнения структуры методом Ритвельда. Для описания формы пиков использовался подход фундаментальных параметров [26]. Положения атомов уточнены в изотропном приближении с «мягкими» ограничениями на расстояния Mo–O и углы связей O–Mo–O. Уточнение проводилось путем постепенного добавления уточняемых параметров с одновременным графическим моделированием фона. С целью сокращения количества уточняемых параметров для всех атомов одного сорта параметры изотропного смещения B_{iso} принимались эквивалентными. Уточнение было стабильным и давало низкие R-факторы, результаты уточнения, полученные для $K_5Pb_{0,5}Zr_{1,5}(MoO_4)_6$, представлены в табл. 1, координаты атомов и параметры изотропного смещения – в табл. 2, расчетная и экспериментальная рентгенограммы с разностной кривой показаны на рис. 1.

Таблица 1. Кристаллографические характеристики и параметры уточнения структуры $K_5Pb_{0,5}Zr_{1,5}(MoO_4)_6$

Table 1. Main parameters of processing and refinement of the $K_5Pb_{0,5}Zr_{1,5}(MoO_4)_6$ sample

Характеристики	Результат
Пространственная группа	Тригональная, $R\bar{3}$
a , Å	10,6604(2)
c , Å	37,9769(9)
V , Å ³	3737,6(2)
Z	6
2θ -интервал, град.	5–70
R_{wp} , %	4,01
R_p , %	2,91
R_{exp} , %	1,60
χ^2	2,51
R_B , %	2,26

Таблица 2. Относительные координаты и изотропные параметры атомного смещения $K_5Pb_{0,5}Zr_{1,5}(MoO_4)_6$, Å²

Table 2. Fractional atomic coordinates and isotropic displacement parameters of $K_5Pb_{0,5}Zr_{1,5}(MoO_4)_6$, Å²

Atom	x	y	z	B_{iso}
Mo1	0,9866(2)	0,6216(2)	0,13196(6)	1,3(3)
Mo2	0,3532(2)	0,2808(2)	0,03023(7)	1,3(3)
Pb1	0	0	0,5	3,2(3)
Zr1	0	0	0	1,6(2)
Zr2	0	0	0,7492(5)	1,6(2)
K1	0	0	0,8503(5)	0,8(3)
K2	0	0	0,6265(6)	0,8(3)
K3	0,261(1)	-0,046(1)	0,0834(5)	0,8(3)
O1	0,9873(7)	0,2858(6)	0,1590(3)	2,6(4)
O2	0,9751(7)	0,7576(7)	0,1084(2)	2,6(4)
O3	1,141(2)	0,6431(8)	0,1277(2)	2,6(4)
O4	0,8561(7)	0,4466(6)	0,1150(2)	2,6(4)
O5	0,4096(6)	0,3334(7)	-0,0117(3)	2,6(4)
O6	0,3455(6)	0,4228(8)	0,0527(2)	2,6(4)
O7	0,1730(7)	0,1188(7)	0,0301(2)	2,6(4)
O8	0,4774(7)	0,2409(6)	0,0518(2)	2,6(4)

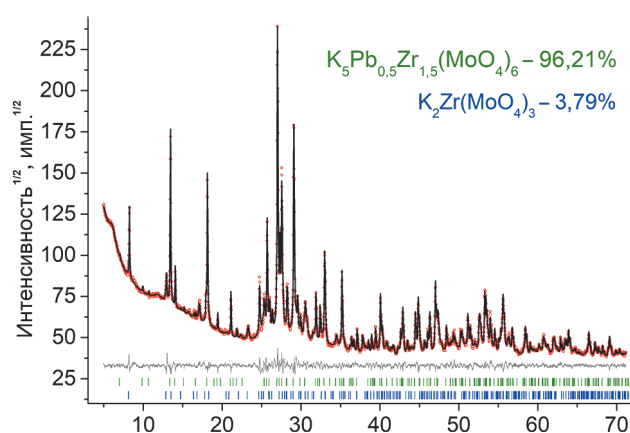


Рис. 1. Экспериментальная (кружки), вычисленная (линия), разностная и штрихрентгенограммы $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$

Fig. 1. Difference Rietveld plot of the $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$ sample

В структуре $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$ атомы Pb и Zr1 расположены в частной позиции (на инверсионной оси $\bar{3}$) и находятся в правильных октаэдрах. Оба атома Mo занимают в ячейке общие положения и характеризуются искаженной тетраэдрической координацией. Атомы K занимают пустоты. Кристаллическая структура представляет собой трехмерный каркас, образующийся из октаэдров PbO_6 и ZrO_6 и тетраэдров MoO_4 , соединяющихся между собой посредством общих кислородных вершин (рис. 2, b).

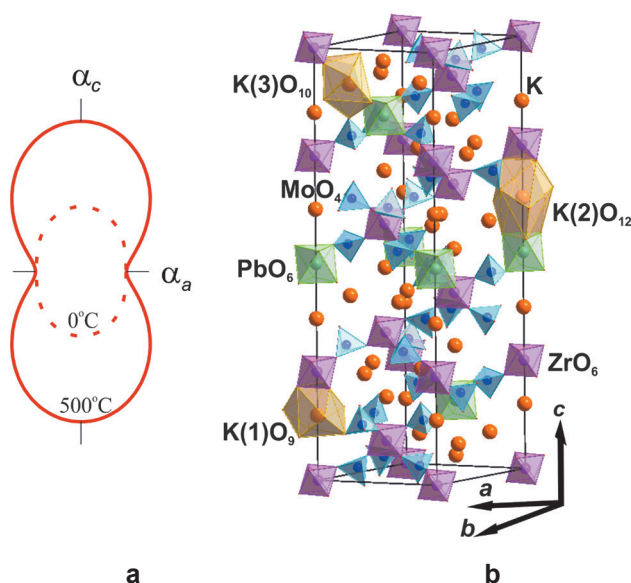


Рис. 2. Сопоставление сечения фигуры коэффициентов теплового расширения (a) с кристаллической структурой $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$ (b) (штриховая линия – 0 °C, сплошная – 500 °C)

Fig. 2. Comparison of the section figure of thermal expansion coefficients (a) and crystal structure of $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$ (b) (dashed line – 0 °C, solid line – 500 °C)

Топологический анализ тройных молибдатов изоформульных аналогов [27] показал, что низкая плотность МТ-каркасов в структурах I типа, а также наличие

широких каналов и полостей, занятых внекаркасными А-катионами, позволяют рассматривать эти материалы как родственные цеолитам.

Термическое расширение структуры $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$. Температурные зависимости параметров тригональной элементарной ячейки (рис. 3) показывают, что расширение структуры вдоль оси *a* в несколько раз меньше расширения вдоль оси *c*.

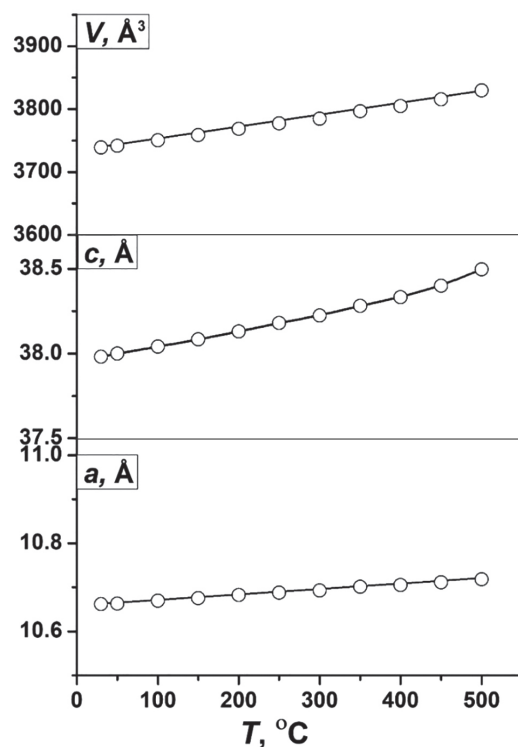


Рис. 3. Параметры и объем тригональной ячейки $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$ при разной температуре

Fig. 3. Temperature dependences of the unit cell parameters of $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$

Зависимости параметров и объема ячейки от температуры аппроксимировали полиномами первой и второй степени (табл. 3).

С использованием уравнений аппроксимации параметров были вычислены коэффициенты термического расширения при разной температуре. Из табл. 4 видно, что значения коэффициентов вдоль обеих осей остается положительным во всем температурном диапазоне, при расширении вдоль *a* остается постоянным, в то время как в направлении *c* с ростом температуры возрастает.

Сечение фигуры коэффициентов теплового расширения сопоставлено со структурой на рис. 2, а. Видно, что значительная анизотропия в направлении *c* обусловлена «мягкими» легко деформирующимися связями К–О и Pb–О, а незначительное и практически не меняющееся с ростом температуры тепловое расширение в плоскости *ab* обусловлено «жесткостью» связей Мо–О и Hf–О. Полученные результаты ($\alpha_v = 60 \times 10^{-6} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ при 500 °C) позволяют отнести $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$ к материалам с высоким термическим расширением [28].

Ионопроводящие свойства $K_5Pb_{0.5}Zr_{1.5}(MoO_4)_6$. Температурная зависимость электропроводности (цикл «нагревание – охлаждение») при различных частотах

Таблица 3. Коэффициенты полиномов: $y = p_0 + p_1 \times x + p_2 \times x^2$

Table 3. Coefficients of polynomials: $y = p_0 + p_1 \times x + p_2 \times x^2$

Параметры элементарной ячейки	$T_1, ^\circ\text{C}$	$T_2, ^\circ\text{C}$	n	p_0	$p_1 \times x \times 10^{-3}$	$p_2 \times x^2 \times 10^{-6}$	R^2
a	30,0	500,0	1	10,65741(43)	0,1209(15)	–	1,00000
c	30,0	500,0	2	37,9677(70)	0,621(70)	0,81(14)	0,99751
V	30,0	500,0	1	3731,0(1,2)	189,1(4,1)	–	1,00000

Таблица 4. Коэффициенты тензора термического расширения ($\times 10^{-6} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$)

Table 4. Thermal expansion coefficients ($\times 10^{-6} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$)

Коэффициент термического расширения	$T, ^\circ\text{C}$					
	0	100	200	300	400	500
α_a	11,4(1)	11,3(1)	11,3(1)	11,3(1)	11,3(1)	11,3(1)
α_c	16(2)	21(1)	24,8(6)	29,0(6)	33(1)	37(2)
α_v	39(1)	43(1)	47(1)	51,6(1)	55,7(1)	59,8(1)

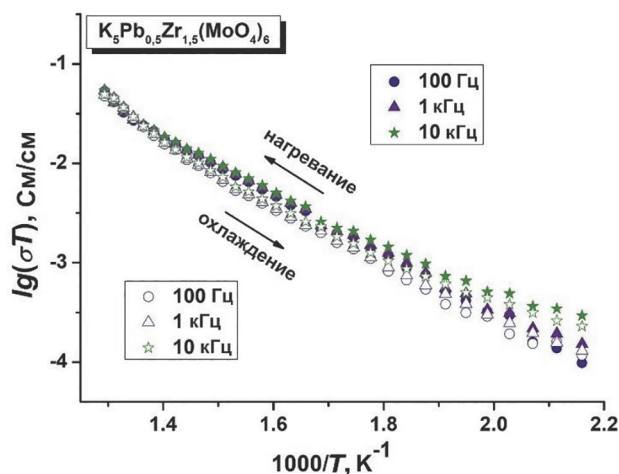


Рис. 4. Температурная зависимость проводимости $\text{K}_5\text{Pb}_{0.5}\text{Zr}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$

Fig. 4. Temperature dependence of $\text{K}_5\text{Pb}_{0.5}\text{Zr}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$ electrical conductivity

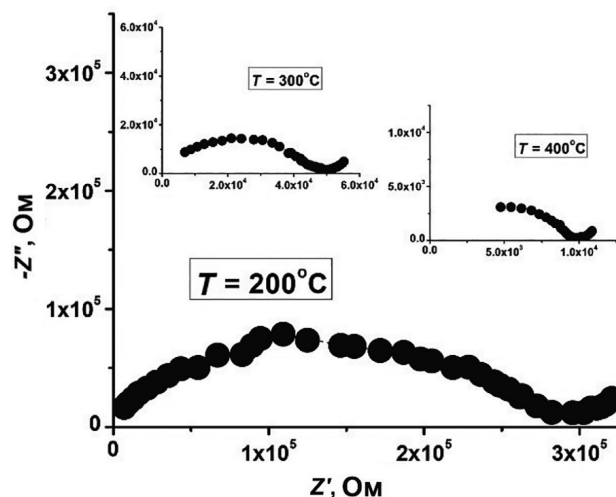


Рис. 5. Годографы импеданса $\text{K}_5\text{Pb}_{0.5}\text{Zr}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$

Fig. 5. Impedance spectroscopy diagrams of $\text{K}_5\text{Pb}_{0.5}\text{Zr}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$

представлены на рис. 4. Проводимость монотонно увеличивается с ростом температуры от 10^{-8} до 10^{-4} См/см, едва заметен температурный гистерезис при 350 °C, а затем проводимость $\text{K}_5\text{Pb}_{0.5}\text{Zr}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$ достигает значений $0,7 \times 10^{-4}$ См/см (500 °C) при $E_a = 0,59$ эВ. Полученные значения ($1,6 \times 10^{-5}$ См/см (400 °C)) сопоставимы с литературными данными изоморфных и близких структурных аналогов $\text{K}_5\text{A}_{0.5}\text{Zr}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$ ($A = \text{Mg}$ (1×10^{-5} См/см), Mn ($1,2 \times 10^{-5}$ См/см), Zn ($1,8 \times 10^{-5}$ См/см), Cd (2×10^{-5} См/см) [29]), $\text{K}_5\text{Mg}_{0.5}\text{Hf}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$ ($4,2 \times 10^{-5}$ См/см [30]). На рис. 5 приведены полученные взаимозависимости активной и реактивной составляющих электрического импеданса для этого соединения при различных температурах, которые являются типичными для ионных проводников с блокирующими электродами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом твердофазного синтеза получено новое соединение $\text{K}_5\text{Pb}_{0.5}\text{Zr}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$, дополняющее ранее открытое семейство изоструктурных тройных

молибдатов состава $\text{K}_5\text{A}_{0.5}\text{Hf}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$. Впервые исследовано термическое расширение $\text{K}_5\text{Pb}_{0.5}\text{Zr}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$ методом высокотемпературной рентгенофазовой дифракции. Было показано, что это соединение относится к сильно расширяющимся веществам при повышении температуры. Кристаллическая структура $\text{K}_5\text{Pb}_{0.5}\text{Zr}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$ уточнена методом Ритвельда, полученное соединение кристаллизуются в пространственной группе $R\bar{3}$ и со структурными аналогами $M^{\text{I}}_5M^{\text{II}}_{0.5}M^{\text{IV}}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$ (где $M^{\text{I}} = \text{K, Rb, Tl}$; $M^{\text{II}} = \text{Ni, Mg, Cu, Zn, Co, Mn, Cd, Sr, Ca, Pb}$; $M^{\text{IV}} = \text{Zr, Hf}$) относится к цеолитоподобным тройным молибдатам, многие из которых обладают заметной ионной проводимостью при повышенных температурах. Для $\text{K}_5\text{Pb}_{0.5}\text{Zr}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$ это подтверждено экспериментально, показано, что при 500 °C значение проводимости достигает $0,7 \times 10^{-4}$ См/см при $E_a = 0,59$ эВ. Полученные результаты оправдывают поиск новых представителей данной группы фаз и стимулируют нас к дальнейшему исследованию их ионопроводящих свойств.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kireeva N., Tsivadze A.Yu. Oxide ceramics of $A_2M_3O_{12}$ family with negative and close-to-zero thermal expansion coefficients: machine learning-based modeling of functional characteristics // *Journal of Alloys and Compounds*. 2024. Vol. 990. P. 174356. DOI: 10.1016/j.jallcom.2024.174356.
2. Marinkovic B.A., Pontón P.I., Romao C.P., Moreira T., White M.A. Negative and near-zero thermal expansion in $A_2M_3O_{12}$ and related ceramic families: a review // *Frontiers in Materials*. 2021. Vol. 8. P. 741560. DOI: 10.3389/fmats.2021.741560.
3. Romao C.P., Perras F.A., Werner-Zwanziger U., Lussier J.A., Miller K.J., Calahoo C.M., et al. Zero thermal expansion in $ZrMgMo_3O_{12}$: NMR crystallography reveals origins of thermoelastic properties // *Chemistry of Materials*. 2015. Vol. 27, no. 7. P. 2633–2646. DOI: 10.1021/acs.chemmater.5b00429.
4. Zi Y., Cun Y., Bai X., Xu Z., Haider A.A., Qiu J., et al. Negative lattice expansion-induced upconversion luminescence thermal enhancement in novel $Na_2MoO_4:Yb^{3+},Er^{3+}$ transparent glass ceramics for temperature sensing applications // *Journal of Materials Chemistry C*. 2023. Vol. 11, no. 4. P. 1541–1549. DOI: 10.1039/D2TC05009A.
5. Zolotova E.S., Solodovnikov S.F., Solodovnikova Z.A., Yudin V.N., Uvarov N.F., Sukhikh A.S. Selection of alkali polymolybdates as fluxes for crystallization of double molybdates of alkali metals, zirconium or hafnium, revisited crystal structures of $K_2Mo_2O_7$, $K_2Mo_3O_{10}$, $Rb_2Mo_3O_{10}$ and ionic conductivity of $A_2Mo_2O_7$ and $A_2Mo_3O_{10}$ ($A = K, Rb, Cs$) // *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 2021. Vol. 154. P. 110054. DOI: 10.1016/j.jpcs.2021.110054.
6. Buzlukov A.L., Baklanova Y.V., Arapova I.Y., Savina A.A., Morozov V.A., Bardet M., et al. $Na_9In(MoO_4)_6$: synthesis, crystal structure, and Na^+ ion diffusion // *Ionics*. 2021. Vol. 27. P. 4281–4293. DOI: 10.1007/s11581-021-04226-3.
7. Xavier D., George A., Loureiro F.J.A., Rajesh S. Electrochemical properties of double molybdate $LiSm(MoO_4)_2$ ceramics with ultra-low sintering temperature // *Electrochimica Acta*. 2023. Vol. 452. P. 142317. DOI: 10.1016/j.electacta.2023.142317.
8. Siva Priya A.A., Solomon S., Thomas J.K., Veena M.R., John A. Structural, optical and electrical characteristics of samarium molybdate nanoceramic // *Ceramics International*. 2024. Vol. 50, no. 1. P. 105–114. DOI: 10.1016/j.ceramint.2023.10.018.
9. Morkhova Y.A., Orlova E.I., Kabanov A.A., Sorokin T.A., Egorova A.V., Gilev A.R., et al. Comprehensive study of conductivity in the series of monoclinic oxymolybdates: Ln_2MoO_6 ($Ln = Sm, Gd, Dy$) // *Solid State Ionics*. 2023. Vol. 400. P. 116337. DOI: 10.1016/j.ssi.2023.116337.
10. Huang M.N., Ma Y.Y., Huang X.Y., Ye S., Zhang Q.Y. The luminescence properties of Bi^{3+} sensitized $Gd_2MoO_6:RE^{3+}$ ($RE = Eu$ or Sm) phosphors for solar spectral conversion // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013. Vol. 115. P. 767–771. DOI: 10.1016/j.saa.2013.06.111.
11. Lee H.-W., Cho Y.-S., Huh Y.-D. The preparation and photoluminescence properties of $Y_{2-x}Eu_x(MoO_4)_3$ nanophosphors and a transparent $Y_{1.4}Eu_{0.6}(MoO_4)_3$ suspension // *Optical Materials*. 2020. Vol. 107. P. 110131. DOI: 10.1016/j.optmat.2020.110131.
12. Zhu R., Jia K., Bi Z., Liu Y., Lyu Y. Realizing white emission in $Sc_2(MoO_4)_3:Eu^{3+}/Dy^{3+}/Ce^{3+}$ phosphors through computation and experiment // *Journal of Solid State Chemistry*. 2020. Vol. 290. P. 121592. DOI: 10.1016/j.jssc.2020.121592.
13. Lv H., Liu L., Wang D., Mai Zh., Yan F., Xing G., et al. Enhanced upconversion emission in Er^{3+}/Yb^{3+} -codoped $Al_2Mo_3O_{12}$ microparticles via doping strategy: towards multimode visual optical thermometer // *Journal of Luminescence*. 2022. Vol. 252. P. 119333. DOI: 10.1016/j.jlumin.2022.119333.
14. Zhang Y., Wang B., Liu Y., Bai G., Fu Z., Liu H. Upconversion luminescence and temperature sensing characteristics of $Yb^{3+}/Tm^{3+}:KLa(MoO_4)_2$ phosphors // *Dalton Transactions*. 2021. Vol. 50, no. 4. P. 1239–1245. DOI: 10.1039/D0DT03979A.
15. Vats B.G., Shafeeq M., Kesari S. Triple molybdates and tungstates scheelite structures: effect of cations on structure, band-gap and photoluminescence properties // *Journal of Alloys and Compounds*. 2021. Vol. 865. P. 158818. DOI: 10.1016/j.jallcom.2021.158818.
16. Lim C.-S., Aleksandrovsky A., Molokeev M., Oreshonkov A., Atuchin V. Structural and spectroscopic effects of Li^+ substitution for Na^+ in $Li_xNa_{1-x}CaGd_{0.5}Ho_{0.05}Yb_{0.45}(MoO_4)_3$ scheelite-type upconversion phosphors // *Molecules*. 2021. Vol. 26, no. 23. P. 7357. DOI: 10.3390/molecules26237357.
17. Ge X., Chen Y., Zhao Q., Chang S., Wang P., Liu S., et al. $K_2M_2(MoO_4)_3$ ($M = Ni, Co, Mn$): potential anode materials with high Li-ion storage properties and good low-temperature performance // *Journal of Alloys and Compounds*. 2022. Vol. 921. P. 166024. DOI: 10.1016/j.jallcom.2022.166024.
18. Gurusamy L., Karuppasamy L., Anandan S., Liu C.-H., Wu J.J. Recent advances on metal molybdate-based electrode materials for supercapacitor application // *Journal of Energy Storage*. 2024. Vol. 79. P. 110122. DOI: 10.1016/j.est.2023.110122.
19. Shameem A., Devendran P., Murugan A., Siva V., Seevakam K., Hussain S., et al. Rare earth doped bismuth molybdate nanoplatelets for boosting electrochemical performance: facile synthesis and device fabrication // *Journal of Alloys and Compounds*. 2023. Vol. 968. P. 171825. DOI: 10.1016/j.jallcom.2023.171825.
20. Panda D., Hota S.S., Choudhary R.N.P. Investigation of structural, topological, and electrical properties of scheelite strontium molybdate for electronic devices // *Inorganic Chemistry Communications*. 2023. Vol. 158. P. 111501. DOI: 10.1016/j.inoche.2023.111501.
21. Tolstov K.S., Politov B.V., Zhukov V.P., Chulkov E.V., Kozhevnikov V.L. The impact of atomic defects on high-temperature stability and electron transport properties in $Sr_2Mg_{1-x}Ni_xMoO_{6-\delta}$ solid solutions // *Journal of Alloys and Compounds*. 2021. Vol. 883. P. 160821. DOI: 10.1016/j.jallcom.2021.160821.
22. Базаров Б.Г., Саранулова А.Е., Базарова Ж.Г. Фазообразование в системах $K_2MoO_4-AMoO_4-Hf(MoO_4)_2$ ($A = Ca, Sr, Ba, Pb$) // *Журнал неорганической химии*. 2005. Т. 50. N 8. С. 1363–1366. EDN: HSCGUL.
23. Coelho A.A. TOPAS and TOPAS-Academic: an optimization program integrating computer algebra and crystallographic objects written in C++ // *Journal of Applied Crystallography*. 2018. Vol. 51. P. 210–218. DOI: 10.1107/S1600576718000183.
24. Bubnova R.S., Firsova V.A., Filatov S.K. Software for determining the thermal expansion tensor and the

graphic representation of its characteristic surface (theta to tensor-TTT) // *Glass Physics and Chemistry*. 2013. Vol. 39. P. 347–350. DOI: 10.1134/S108765961303005X.

25. Базаров Б.Г., Клевцова Р.Ф., Сарапулова А.Е., Федоров К.Н., Глинская Л.А., Базарова Ж.Г. Синтез и кристаллическое строение тройного молибдата состава $K_5Pb_{0.5}Hf_{1.5}(MoO_4)_6$ // *Журнал структурной химии*. 2005. Т. 46. N 4. С. 776–780. DOI: jsc.niic.nsc.ru/article/13731/. EDN: HRSROL.

26. Cheary R.W., Coelho A. A fundamental parameters approach to X-ray line-profile fitting // *Journal of Applied Crystallography*. 1992. Vol. 25. P. 109–121. DOI: 10.1107/S0021889891010804.

27. Aksenov S.M., Pavlova E.T., Popova N.N., Tsyrenova G.D., Lazoryak B.I. Stoichiometry and topological features of triple molybdates $A_xB_yC_z(MoO_4)_n$ with the heteropolyhedral open MT-frameworks: synthesis,

crystal structure of $Rb_5(Hf_{1.5}Co_{0.5}(MoO_4)_6)$, and comparative crystal chemistry // *Solid State Sciences*. 2024. Vol. 151. P. 107525. DOI: 10.1016/j.solidstatesciences.2024.107525.

28. Pet'kov V.I., Shipilov A.S., Sukhanov M.V. Thermal expansion of $MZr_2(AsO_4)_3$ and $MZr_2(TO_4)_x(PO_4)_{3-x}$ ($M = Li, Na, K, Rb, Cs$; $T = As, V$) // *Inorganic Materials*. 2015. Vol. 51. P. 1079–1085. DOI: 10.1134/S002016851510012X.

29. Bazarov B.G., Fedorov K.N., Bazarova S.T., Bazarova Zh.G. Electrical properties of molybdates in the systems $M_2MoO_4-AMoO_4-Zr(MoO_4)_2$ // *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2002. Vol. 75. P. 1026–1028. DOI: 10.1023/A:1020377905907.

30. Grossman V.G., Molokeev M.S., Bazarova J.G., Bazarov B.G. High ionic conductivity of $K_{5-x}Tl_x(Mg_{0.5}Hf_{1.5})(MoO_4)_6$ ($0 \leq x \leq 5$) solid solutions // *Solid State Sciences*. 2022. Vol. 134. P. 107027. DOI: 10.1016/j.solidstatesciences.2022.107027.

REFERENCES

1. Kireeva N., Tsivadze A.Yu. Oxide ceramics of $A_2M_3O_{12}$ family with negative and close-to-zero thermal expansion coefficients: machine learning-based modeling of functional characteristics. *Journal of Alloys and Compounds*. 2024;990:174356. DOI: 10.1016/j.jallcom.2024.174356.

2. Marinkovic B.A., Pontón P.I., Romao C.P., Moreira T., White M.A. Negative and near-zero thermal expansion in $A_2M_3O_{12}$ and related ceramic families: a review. *Frontiers in Materials*. 2021;8:741560. DOI: 10.3389/fmats.2021.741560.

3. Romao C.P., Perras F.A., Werner-Zwanziger U., Lussier J.A., Miller K.J., Calahoo C.M., et al. Zero thermal expansion in $ZrMgMo_3O_{12}$: NMR crystallography reveals origins of thermoelastic properties. *Chemistry of Materials*. 2015;27(7):2633–2646. DOI: 10.1021/acs.chemmater.5b00429.

4. Zi Y., Cun Y., Bai X., Xu Z., Haider A.A., Qiu J., et al. Negative lattice expansion-induced upconversion luminescence thermal enhancement in novel $Na_2MoO_4:Yb^{3+},Er^{3+}$ transparent glass ceramics for temperature sensing applications. *Journal of Materials Chemistry C*. 2023;11(4):1541–1549. DOI: 10.1039/D2TC05009A.

5. Zolotova E.S., Solodovnikov S.F., Solodovnikova Z.A., Yudin V.N., Uvarov N.F., Sukhikh A.S. Selection of alkali polymolybdates as fluxes for crystallization of double molybdates of alkali metals, zirconium or hafnium, revisited crystal structures of $K_2Mo_2O_7$, $K_2Mo_3O_{10}$, $Rb_2Mo_3O_{10}$ and ionic conductivity of $A_2Mo_2O_7$ and $A_2Mo_3O_{10}$ ($A = K, Rb, Cs$). // *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 2021;154:110054. DOI: 10.1016/j.jpcs.2021.110054.

6. Buzlukov A.L., Baklanova Y.V., Arapova I.Y., Savina A.A., Morozov V.A., Bardet M., et al. $Na_9In(MoO_4)_6$: synthesis, crystal structure, and Na^+ ion diffusion. *Ionics*. 2021;27:4281–4293. DOI: 10.1007/s11581-021-04226-3.

7. Xavier D., George A., Loureiro F.J.A., Rajesh S. Electrochemical properties of double molybdate $LiSm(MoO_4)_2$ ceramics with ultra-low sintering temperature. *Electrochimica Acta*. 2023;452:142317. DOI: 10.1016/j.electacta.2023.142317.

8. Siva Priya A.A., Solomon S., Thomas J.K., Veena M.R., John A. Structural, optical and electrical characteristics of samarium molybdate nanoceramic. *Ceramics International*. 2024;50(1):105–114. DOI: 10.1016/j.ceramint.2023.10.018.

9. Morkhova Y.A., Orlova E.I., Kabanov A.A., Sorokin T.A., Egorova A.V., Gilev A.R., et al. Comprehensive study of con-

ductivity in the series of monoclinic oxymolybdates: Ln_2MoO_6 ($Ln = Sm, Gd, Dy$). *Solid State Ionics*. 2023;400:116337. DOI: 10.1016/j.ssi.2023.116337.

10. Huang M.N., Ma Y.Y., Huang X.Y., Ye S., Zhang Q.Y. The luminescence properties of Bi^{3+} sensitized $Gd_2MoO_6:RE^{3+}$ ($RE = Eu$ or Sm) phosphors for solar spectral conversion. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2013;115:767–771. DOI: 10.1016/j.saa.2013.06.111.

11. Lee H.-W., Cho Y.-S., Huh Y.-D. The preparation and photoluminescence properties of $Y_{2-x}Eu_x(MoO_4)_3$ nanophosphors and a transparent $Y_{1.4}Eu_{0.6}(MoO_4)_3$ suspension. *Optical Materials*. 2020;107:110131. DOI: 10.1016/j.optmat.2020.110131.

12. Zhu R., Jia K., Bi Z., Liu Y., Lyu Y. Realizing white emission in $Sc_2(MoO_4)_3:Eu^{3+}/Dy^{3+}/Ce^{3+}$ phosphors through computation and experiment. *Journal of Solid State Chemistry*. 2020;290:121592. DOI: 10.1016/j.jssc.2020.121592.

13. Lv H., Liu L., Wang D., Mai Zh., Yan F., Xing G., et al. Enhanced upconversion emission in Er^{3+}/Yb^{3+} -co-doped $Al_2Mo_3O_{12}$ microparticles via doping strategy: towards multimode visual optical thermometer. *Journal of Luminescence*. 2022;252:119333. DOI: 10.1016/j.jlumin.2022.119333.

14. Zhang Y., Wang B., Liu Y., Bai G., Fu Z., Liu H. Upconversion luminescence and temperature sensing characteristics of $Yb^{3+}/Tm^{3+}:KLa(MoO_4)_2$ phosphors. *Dalton Transactions*. 2021;50(4):1239–1245. DOI: 10.1039/D0DT03979A.

15. Vats B.G., Shafeeq M., Kesari S. Triple molybdates and tungstates scheelite structures: effect of cations on structure, band-gap and photoluminescence properties. *Journal of Alloys and Compounds*. 2021;865:158818. DOI: 10.1016/j.jallcom.2021.158818.

16. Lim C.-S., Aleksandrovsky A., Molokeev M., Oreshonkov A., Atuchin V. Structural and spectroscopic effects of Li^+ substitution for Na^+ in $Li_xNa_{1-x}CaGd_{0.5}Ho_{0.05}Yb_{0.45}(MoO_4)_3$ scheelite-type upconversion phosphors. *Molecules*. 2021;26(23):7357. DOI: 10.3390/molecules26237357.

17. Ge X., Chen Y., Zhao Q., Chang S., Wang P., Liu S., et al. $K_2M_2(MoO_4)_3$ ($M = Ni, Co, Mn$): potential anode materials with high Li-ion storage properties and good low-temperature performance. *Journal of Alloys and Compounds*. 2022;921:166024. DOI: 10.1016/j.jallcom.2022.166024.

18. Gurusamy L., Karuppasamy L., Anandan S., Liu C.-H., Wu J.J. Recent advances on metal molybdate-based elec-

trode materials for supercapacitor application. *Journal of Energy Storage*. 2024;79:110122. DOI: 10.1016/j.est.2023.110122.

19. Shameem A., Devendran P., Murugan A., Siva V., Seevakan K., Hussain S., et al. Rare earth doped bismuth molybdate nanoplatelets for boosting electrochemical performance: facile synthesis and device fabrication. *Journal of Alloys and Compounds*. 2023;968:171825. DOI: 10.1016/j.jallcom.2023.171825.

20. Panda D., Hota S.S., Choudhary R.N.P. Investigation of structural, topological, and electrical properties of scheelite strontium molybdate for electronic devices. *Inorganic Chemistry Communications*. 2023;158:111501. DOI: 10.1016/j.inoche.2023.111501.

21. Tolstov K.S., Politov B.V., Zhukov V.P., Chulkov E.V., Kozhevnikov V.L. The impact of atomic defects on high-temperature stability and electron transport properties in $\text{Sr}_2\text{Mg}_{1-x}\text{Ni}_x\text{MoO}_{6-\delta}$ solid solutions. *Journal of Alloys and Compounds*. 2021;883:160821. DOI: 10.1016/j.jallcom.2021.160821.

22. Bazarov B.G., Sarapulova A.E., Bazarova Z.G. Phase formation in the systems $\text{K}_2\text{MoO}_4\text{--AMoO}_4\text{--Hf}(\text{MoO}_4)_2$ ($A = \text{Ca, Sr, Ba, Pb}$). *Zhurnal neorganicheskoi khimii*. 2005;50(8):1363-1366. EDN: HSCGUL.

23. Coelho A.A. TOPAS and TOPAS-Academic: an optimization program integrating computer algebra and crystallographic objects written in C++. *Journal of Applied Crystallography*. 2018;51:210-218. DOI: 10.1107/S1600576718000183.

24. Bubnova R.S., Firsova V.A., Filatov S.K. Software for determining the thermal expansion tensor and the graphic representation of its characteristic surface (theta

to tensor-TTT). *Glass Physics and Chemistry*. 2013;39:347-350. DOI: 10.1134/S108765961303005X.

25. Bazarov B.G., Sarapulova A.E., Fedorov K.N., Bazarova Zh.G., Klevtsova R.F., Glinskaya L.A. Synthesis and crystal structure of ternary molybdate compound $\text{K}_5\text{Pb}_{0.5}\text{Hf}_{1.5}(\text{MoO}_4)_6$. *Zhurnal strukturnoi khimii*. 2005;46(4):776-780. DOI: jsc.niic.nsc.ru/article/13731/. EDN: HRSROL.

26. Cheary R.W., Coelho A. A fundamental parameters approach to X-ray line-profile fitting. *Journal of Applied Crystallography*. 1992;25:109-121. DOI: 10.1107/S0021889891010804.

27. Aksenov S.M., Pavlova E.T., Popova N.N., Tsyrenova G.D., Lazoryak B.I. Stoichiometry and topological features of triple molybdates $\text{A}_x\text{B}_y\text{C}_z(\text{MoO}_4)_n$ with the heteropolyhedral open MT-frameworks: synthesis, crystal structure of $\text{Rb}_5(\text{Hf}_{1.5}\text{Co}_{0.5}(\text{MoO}_4)_6)$, and comparative crystal chemistry. *Solid State Sciences*. 2024;151:107525. DOI: 10.1016/j.solidstatesciences.2024.107525.

28. Pet'kov V.I., Shipilov A.S., Sukhanov M.V. Thermal expansion of $\text{MZr}_2(\text{AsO}_4)_3$ and $\text{MZr}_2(\text{TO}_4)_x(\text{PO}_4)_{3-x}$ ($M = \text{Li, Na, K, Rb, Cs}$; $T = \text{As, V}$). *Inorganic Materials*. 2015;51:1079-1085. DOI: 10.1134/S002016851510012X.

29. Bazarov B.G., Fedorov K.N., Bazarova S.T., Bazarova Zh.G. Electrical properties of molybdates in the systems $\text{M}_2\text{MoO}_4\text{--AMoO}_4\text{--Zr}(\text{MoO}_4)_2$. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2002;75:1026-1028. DOI: 10.1023/A:1020377905907.

30. Grossman V.G., Molokeev M.S., Bazarova J.G., Bazarov B.G. High ionic conductivity of $\text{K}_{5-x}\text{Ti}_x(\text{Mg}_{0.5}\text{Hf}_{1.5})(\text{MoO}_4)_6$ ($0 \leq x \leq 5$) solid solutions. *Solid State Sciences*. 2022;134:107027. DOI: 10.1016/j.solidstatesciences.2022.107027.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Ковтунец Евгений Викторович,

научный сотрудник,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
✉ kovtunets@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1301-1983>

Спиридонова Татьяна Сергеевна,

к.х.н., старший научный сотрудник,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
spiridonova@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7498-5103>

Тушинова Юнна Лудановна,

к.х.н., доцент, научный сотрудник,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
tushinova@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1032-8854>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Evgeniy V. Kovtunets,

Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
✉ kovtunets@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1301-1983>

Tatyana S. Spiridonova,

Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
spiridonova@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7498-5103>

Yunna L. Tushinova,

Cand. Sci. (Chemistry),
Associate Professor, Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
tushinova@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1032-8854>

Логвинова Александра Владимировна,
инженер,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
logvinova_alexandra@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9850-2719>

Базарова Цырендзжит Тушиновна,
к.х.н., ведущий инженер,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
basst@list.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9697-6320>

Базаров Баир Гармаевич,
д.ф.-м.н., доцент, ведущий научный сотрудник,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
jbaz@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1712-6964>

Вклад авторов

Е.В. Ковтунец – обработка полученных данных, осуществление расчетов, подготовка иллюстративного материала, развитие методологии, обсуждение результатов, написание текста статьи.
Т.С. Спиридонова – обработка полученных данных, осуществление расчетов, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи.
Ю.Л. Тушинова – обсуждение результатов, проведение экспериментов, написание текста статьи.
А.В. Логвинова – проведение экспериментов.
Ц.Т. Базарова – проведение экспериментов.
Б.Г. Базаров – обсуждение результатов, разработка концепции исследования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 26.06.2024.
Одобрена после рецензирования 25.08.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

Alexandra V. Logvinova,
Engineer,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
logvinova_alexandra@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9850-2719>

Tsyrendyzhit T. Bazarova,
Cand. Sci. (Chemistry), Leading Engineer,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
basst@list.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9697-6320>

Bair G. Bazarov,
Dr. Sci. (Physics and Mathematics),
Associate Professor, Leading Researcher,
Baikal Institute of Nature Management SB RAS,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
jbaz@binm.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1712-6964>

Contribution of the authors

Evgeniy V. Kovtunets – methodology development, data processing, calculations, results discussion, illustrative material, writing the text of manuscript.
Tatyana S. Spiridonova – data processing, calculation, illustrative material, writing the text of manuscript.
Yunna L. Tushinova – conducting experiments, results discussion, writing the text of manuscript.
Alexandra V. Logvinova – conducting experiments.
Tsyrendyzhit T. Bazarova – conducting experiments.
Bair G. Bazarov – research concept development, 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 26.06.2024.
Approved after reviewing 25.08.2024.
Accepted for publication 30.11.2024.



Synthesis and antimicrobial activity of functionally substituted 1,3-dioxacycloalkanes

Yulianna G. Borisova*✉, Audar K. Bulgakov**, Nailya S. Khusnutdinova**,
Gul'nara Z. Raskildina*, Semen S. Zlotsky*, Augul' A. Bulgakova**,
Svetlana A. Meshcheryakova**, Rimma M. Sultanova*

*Ufa State Petroleum Technological University, Ufa, Russia

**Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Abstract. One of the directions in the development of organic chemistry is the synthesis of biologically active compounds, including those with bactericidal activity, based on available petrochemical raw materials. In order to expand the library of bioactive compounds containing a 1,3-dioxacyclane fragment, the synthesis of derivatives of 5-acyl-5-isopropyl-1,3-dioxane – 1-(5-isopropyl-1,3-dioxane-5-yl)ethanol and (5-isopropyl-1,3-dioxane-5-yl)ethyl phenyl carbamate was carried out. The effect of synthesized compounds containing a 1,3-dioxacyclane fragment on the growth of strains of gram-negative and gram-positive bacteria, lower fungi *Candida albicans* was studied. It was found that 2-methyl-2-ethyl-4-chloromethyl-1,3-dioxolane, containing a chloromethyl group, has an antimicrobial effect against gram-positive and gram-negative test cultures and weak antifungal activity (minimum inhibitory concentration is 100 µg/mL) against lower fungi *Candida albicans*. 1-(5-Isopropyl-1,3-dioxan-5-yl)ethanol exhibits antifungal activity (minimum inhibitory concentration is 2 µg/mL) and sharply reduces antimicrobial activity against *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* (minimum inhibitory concentration is 100 µg/mL), in contrast to the structurally similar 2-methyl-2-ethyl-4-hydroxymethyl-1,3-dioxolane, which did not show similar properties. 5-Acyl-5-isopropyl-1,3-dioxane, containing a carbonyl group in its structure, showed antimicrobial activity (minimum inhibitory concentration is 25 µg/mL) against gram-negative test cultures, with the exception of *Pseudomonas aeruginosa*. Heterocycles (2-methyl-2-ethyl-4-chloromethyl-, 2-isobutyl-2,4-dimethyl-, 2-methyl-2-isobutyl-4-chloromethyl- and 2-methyl-2-isobutyl-4-hydroxymethyl-1,3-dioxolane) at concentrations up to 100 µg/mL did not inhibit the vital activity of the studied bacteria and lower fungi. The results obtained show the prospect of continuing the search for new antimicrobial and antifungal drugs of the series of 1,3-dioxacycloalkanes, the structure of which is fundamentally different from the known antibacterial drugs.

Keywords: polyols, condensation, 1,3-dioxacycloalkanes, antimicrobial activity, antifungal activity

Funding. The work was carried out within the framework of the state task of the Ministry of Education and Science of Russia in the field of scientific activity FEUR-2023-0006 "Development and creation of small-scale products and reagents (corrosion and scale inhibitors, antioxidants, biocides, additives, etc.) for petrochemical processes and purification of aquatic environments from contaminants that replace imported substances and materials. Theoretical and experimental approaches".

For citation: Borisova Yu.G., Bulgakov A.K., Khusnutdinova N.S., Raskildina G.Z., Zlotsky S.S., Bulgakova A.A., et al. Synthesis and antimicrobial activity of functionally substituted 1,3-dioxacycloalkanes. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):453-461. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.954. EDN: OTYUUO.

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Научная статья
УДК 547.849,615.281
EDN: OTYUUO
DOI: 10.21285/achb.954

Синтез и антимикробная активность функционально замещенных 1,3-диоксациклоалканов

Ю.Г. Борисова*✉, А.К. Булгаков**, Н.С. Хуснутдинова**, Г.З. Раскильдина*,
С.С. Злотский*, А.А. Булгакова**, С.А. Мещерякова**, Р.М. Султанова*

*Уфимский государственный нефтяной технологический университет, Уфа, Россия

**Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

Аннотация. Одним из направлений развития органической химии является синтез биологически активных соединений, в том числе обладающих бактерицидной активностью, на основе доступного нефтехимического сырья. С целью расширения библиотеки биоактивных соединений, содержащих 1,3-диоксацикловый фрагмент, осуществлен синтез производных 5-ацил-5-изопропил-1,3-диоксана – 1-(5-изопропил-1,3-диоксан-5-ил)этанола и 1-(5-изопропил-1,3-диоксан-5-ил)этилфенилкарбамата. Изучено влияние функционально 2,2,4-тризамещенных 1,3-диоксоланов и синтезированных соединений, содержащих 1,3-диоксанный фрагмент, на рост штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий, низших грибов *Candida albicans*. Исследования структуры и активности показали, что 2-метил-2-этил-4-хлорметил-1,3-диоксолан, содержащий хлорметильную группу, обладает противомикробным действием в отношении грамположительных и грамотрицательных тест-культур и слабой противогрибковой активностью (минимальная ингибирующая концентрация 100 мкг/мл) в отношении более низких грибов *Candida Albicans*. 1-(5-Изопропил-1,3-диоксан-5-ил)этанол проявляет противогрибковую активность (минимальная ингибирующая концентрация 2 мкг/мл) и резко снижает антимикробную активность против *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* (минимальная ингибирующая концентрация 100 мкг/мл), в отличие от сходного по строению 2-метил-2-этил-4-гидроксиметил-1,3-диоксолана, не проявившего аналогичных свойств. 5-Ацил-5-изопропил-1,3-диоксан, содержащий в структуре карбонильную группу, проявил антимикробную активность (минимальная ингибирующая концентрация 25 мкг/мл) в отношении грамотрицательных тест-культур, за исключением *Pseudomonas aeruginosa*. Гетероциклы (2-метил-2-этил-4-хлорметил-, 2-изобутил-2,4-диметил-, 2-метил-2-изобутил-4-хлорметил- и 2-метил-2-изобутил-4-гидроксиметил-1,3-диоксоланы) в концентрациях до 100 мкг/мл не ингибировали жизнедеятельность изученных бактерий и низших грибов. Полученные результаты показывают перспективность продолжения поиска новых антимикробных и противогрибковых препаратов ряда 1,3-диоксациклоалканов, структура которых принципиально отличается от известных антибактериальных препаратов.

Ключевые слова: полиолы, конденсация, 1,3-диоксациклоалканы, противомикробная активность, противогрибковое действие

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки России в сфере научной деятельности FEUR-2023-0006 «Разработка и создание малотоннажных продуктов и реагентов (ингибиторы коррозии и солеотложения, антиоксиданты, биоциды, присадки и др.) для процессов нефтегазохимии и очистки водных сред от загрязнений, замещающих импортные вещества и материалы. Теоретические и экспериментальные подходы».

Для цитирования: Борисова Ю.Г., Булгаков А.К., Хуснутдинова Н.С., Раскильдина Г.З., Злотский С.С., Булгакова А.А. [и др.]. Синтез и антимикробная активность функционально замещенных 1,3-диоксациклоалканов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 453–461. DOI: 10.21285/achb.954. EDN: OTYUUO.

INTRODUCTION

It is known that during the processing of plant raw materials, various cyclic acetals are formed, which are used as components and additives to motor fuels [1–6]. The use of substituted 1,3-dioxolanes for the synthesis of pharmaceutical or polymer products is also described [7]. 2-(2-Beta-bromoethyl)-1,3-dioxolane is used to obtain substances exhibiting anti-cancer properties [8]. Hydroxyacetals – “sol-ketal” and a mixture of 4-hydroxymethyl-1,3-dioxane and 4-hydroxymethyl-1,3-dioxolane have

proven to be effective additives to repellents [9], and diacetals of diglycerol or dipentaerythritol are proposed as components for polymeric materials [10]. Like molecules containing cycloacetal moiety are important intermediates that can be modified into more complex structures exhibiting a broad spectrum of biological activity [11]. Thus, derivatives of 2,2-disubstituted-1,3-dioxolanes exhibit antiviral, antiplatelet, anticoagulant, fungicidal, herbicidal activity, and can also be used to produce pheromones [12–20]. In addition, it is known that the introduction of

the acetal fragment enhances the antibacterial activity of the compounds due to an increase in the lipophilicity of the molecule [21].

In the present work, the synthesis of 5,5-disubstituted 1,3-dioxanes was carried out and the antimicrobial activity of substituted 5- and 6-membered cyclic acetals was studied.

MATERIALS AND METHODS

All reagents and starting materials were obtained from commercial sources and used as received. All solvents were dried according to standard literature procedures. All reactions were performed under an atmosphere of argon unless indicated otherwise. ^1H NMR, and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance-III 500 MHz spectrometer with chemical shift values in parts per million (ppm) relative to TMS (δ_{H} 0.00 and δ_{C} 0.0) or residual chloroform (δ_{H} 7.28 and δ_{C} 77.2) as standard. Proton and carbon assignments are based on two-dimensional HSQC, HMBC, COSY and DEPT experiments. Mass spectra were obtained using Thermo Finnigan MAT 95 XP spectrometer. Melting points were measured on a micro melting point apparatus.

2,2,4-Trisubstituted 1,3-dioxolanes **1–6** were prepared according to the previously described procedure [22].

Synthesis of 5-acyl-5-isopropyl-1,3-dioxane 7. A mixture of 6.3 mL (0.05 mol) of 4-methyl-2-pentanone, 0.225 g (0.075 mol) of paraformaldehyde, 80 mL of benzene, and 0.4 mL of concentrated sulfuric acid ($d = 1.84$ g/mL) and was stirred at 80 °C until the calculated amount of water was released. Then the mixture was cooled to room temperature, washed with water, dried over calcium chloride, filtered and evaporated. The product was isolated by vacuum distillation.

Yield 80%, colorless liquid, bp 129–131 °C (3 mmHg). ^1H NMR(500 MHz, CDCl_3), δ , ppm (J , Hz): 0.90 d (3H, $J = 7.0$, CH_3CH_3); 1.00 d (3H, $J = 7.0$, CH_3CH_3); 1.63 m (1H, CHCH_3); 2.27 s (3H, CH_3CO); 3.48 d (2H, $J = 11.5$, 4- CH_2); 4.34 d (2H, $J = 11.4$, 6- CH_2); 4.62 d (1H, $J = 6.0$ 2- CH_2^a); 4.98 d (1H, $J = 6.0$, 2- CH_2^b). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ , ppm: 16.0 (2 CH_3CH); 26.9 (CH_3CO); 29.3 (CHCH_3); 51.2 (C-5); 71.8 (C-4, C-6); 94.1 (C-2); 209.9 (C=O). Mass spectrum (EI, 70 eV), m/z (I_{rel} , %): 158 (2) [M] $^+$, 12 (50), 110 (20), 99 (30), 86 (70), 83 (80), 71 (20), 57 (40), 43 (100).

The procedure for the hydrogenation of ketones 7. The Pd/C catalyst (CAS 7440-05-3, TU 2172-013-94509069-200, palladium content 5%) was ground in a mortar before use, sieved, and kept in a desiccator. For hydrogenation, a flow-through catalytic apparatus Catakon was used, consisting of a metal reactor with a heating jacket, a burette for feeding raw materials, an automatic pump, and a control unit. Operating parameters of the apparatus are volume of the reaction zone – 15 cm^3 , temperature range – 50–600 °C, pressure up to 100 atm. An activated Pd/C catalyst was put into a flow reactor. At a given temperature (250 °C) at a rate of 0.27 mL/min, 15 mL of ketone **7** (0.01 mol), hydrogen were fed at a rate of 0.23 mL/min, and the pressure was about 8 kg/cm. The obtained catalyze was filtered off and evaporated.

Yield 85%, colorless liquid, bp 131–132 °C (2 mmHg). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ ppm (J , Hz): 0.90 s (6H, CH_3CH); 1.00 d (3H, $J = 7$, CH_3); 1.73–1.81 m (1H, CHCH_3); 3.09 s (br OH); 3.72 dd (2H, $J = 6.0$, $J = 11.0$, 4- CH_2); 4.00 d (1H, $J = 11.6$, CH); 4.12 dd (2H, $J = 6.6$, $J = 11.5$, 6- CH_2); 4.67 d (1H, $J = 5.8$, 2- CH_2^a); 4.88 d (1H, $J = 5.8$, 2- CH_2^b). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ , ppm: 16.0 (2 CH_3CH); 19.3 (CHCH_3); 26.9 (CH_3CO); 39.2 (C-5); 68.4 (CHOH); 72.4 (C-4); 72.7 (C-6); 94.1 (C-2). Mass spectrum (EI, 70 eV), m/z (I_{rel} , %): 160 (2) [M] $^+$, 72 2 (60), 57 (50), 45 (30), 43 (70), 39 (20), 32 (100).

Synthesis of 1-(5-isopropyl-1,3-dioxane-5-yl)ethylcarbamate 9. To a mixture of 8.7 g (0.05 mol) of alcohol **8** in 15 mL of hexane was added 3 g (0.025 mol) of phenyl isocyanate in 5 mL of hexane. Then reaction mass was heated with stirring to 30 °C. Upon completion of the reaction (TLC monitoring), the mixture was cooled to room temperature, the precipitated crystals were filtered off on a Buchner funnel, washed with water, separated from hexane, dried in air, and recrystallized from isopropanol.

Yield 92%. White powder, $mp = 101$ – 103 °C ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ , ppm (J , Hz): 0.90 s (6H, CH_3CH); 1.11, 1.28 d (3H, $J = 7$, CH_3); 1.91–1.95 m (1H, CHCH_3); 3.67–4.01 m (5H, 4- CH_2 , 6- CH_2 , $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}$); 4.88 d (1H, $J = 6.6$, 2- CH_2^a); 5.12 d (1H, $J = 6.6$, 2- CH_2^b); 7.00–7.50 m (5H); 9.49, 9.67 s (1H, NH). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ , ppm: 15.8 (CH_3CH); 21.4 (CH_3CH); 21.4 (CH_3CH); 29.4 (CHCH_3); 68.2 (C-4); 71.4 (C-6); 72.3 ($\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}$); 91.1 (C-2); 127.9 (Ph); 128.5 (Ph); 138.9 (Ph); 163.7 (CO_2).

Antimicrobial activity. Antibacterial and antifungal activities of 1,3-dioxolane and 1,3-dioxane derivatives were analyzed using the agar diffusion and the twofold broth (pH 7.2–7.4) dilution methods¹. Microbial strains of the department of Microbiology and Virology, Bashkir State Medical University deposited at L.A. Tarasevich State Institute of Standardization and Control of Biomedical Preparations, the Ministry of Health of the Russian Federation were used as test organisms: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus pyogenes* and lower fungi *Candida albicans*. Ceftriaxone (“Biokhimik”, Russia), pimaricin (natamycin, Astellas, Netherlands) were taken as reference standards. Test compounds (100 mg) and reference standards were dissolved in 1 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO). These solutions were diluted in beef extract broth to achieve a final concentration of 10 mg/mL (stock solution). The nutrient broth inoculated with 2.0×10^6 colony forming units (c.f.u)/mL, was used. The cultures were incubated for 72 h at 37 °C and for 48 h at 25 °C, then the growth was monitored visually. The lowest concentration (highest dilution) required to arrest the growth of bacteria was regarded as minimum inhibitory concentration (MIC).

RESULTS AND DISCUSSION

In the work we studied 2,2,4-trisubstituted 1,3-dioxolanes **1–6**, which were synthesized by us earlier (Fig. 1) [22], as well as novel 5,5-dialkyl substituted-1,3-dioxanes (Fig. 2)

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / ред.: А.Н. Миронов, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильев, О.А. Верстакова, М.В. Журавлева, В.К. Рамн Лепяхин. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. EDN: SDEWMP.

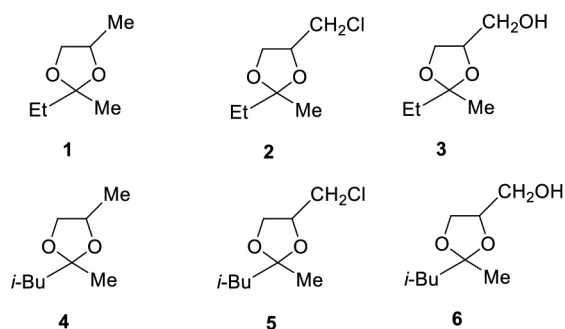


Fig. 1. 2,2,4-Trisubstituted 1,3-dioxolanes **1–6**

Рис. 1. Структуры 2,2,4-тризамещенных 1,2-диоксоланов **1–6**

Dioxane **7** was prepared by reaction of *i*BuCOMe with paraformaldehyde in presence of sulfuric acid (C_6H_6 , 80 °C) (path a) [23]. Subsequent hydrogenation of dioxane **7** in the presence of metal-containing catalysts (Pt/Re, Pd/C, Ni/kieselguhr, and Ni/Mo) led to target product **8** with 60–90% yield (path b) [24]. Dioxane **8** reacted smoothly with phenyl isocyanate in hexane at 30 °C degrees to form the corresponding carbamate **9** (path c) in 90% yield (see Fig. 2).

Carbamate **9** is formed as a mixture of two isomers due to inversion of nitrogen atoms. The 1H and ^{13}C NMR spectra show a doubled set of signals of hydrogen and carbon atoms, respectively (Fig. 3).

In the 1H NMR spectrum (see Fig. 3) of carbamate **9** recorded in solution of DMSO- d_6 , there are signals characteristic for two double signals of 1,3-dioxane cycle which are registered in weak field in interval δ_H 3.67 to 4.01 ppm. Protons at C(2) carbon atom is also manifested by two doublets in the weak field δ_H 4.88–5.12 ppm with spin-spin coupling constant 6.6 Hz. Additionally, we note that the protons of the phenyl group are manifested by complexes in the area δ_H 7.00–7.50 ppm, and protons of secondary NH group from two isomers as expanded synthetics at δ_H 9.49 and 9.67 ppm respectively.

All synthesized functionally substituted 1,3-dioxacyclanes **1–9** were tested for antimicrobial activity. The results of the screening demonstrated that 1,3-dioxacycloalkanes **2** and **8** exhibited pronounced antimicrobial activity against the most of the studied test cultures, the MIC values were 2–8 $\mu g/mL$, while 1,3-dioxane **9** at a concentration of 100 $\mu g/mL$ did not suppress the growth of the studied microbial strains as shown in Table.

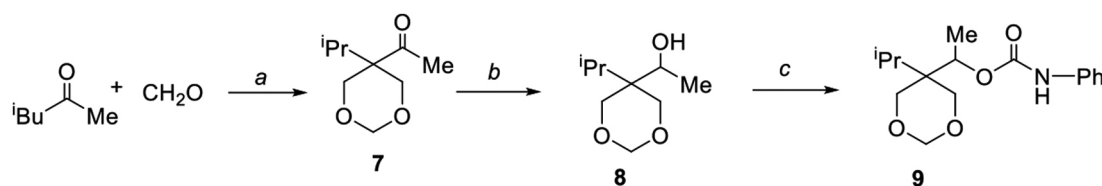


Fig. 2. Scheme for the preparation of (1-(5-isopropyl-1,3-dioxan-5-yl)ethyl phenyl carbamate **9**

Рис. 2. Схема получения (1-(5-изопропил-1,3-диоксан-5-ил)этилфенилкарбамата **9**

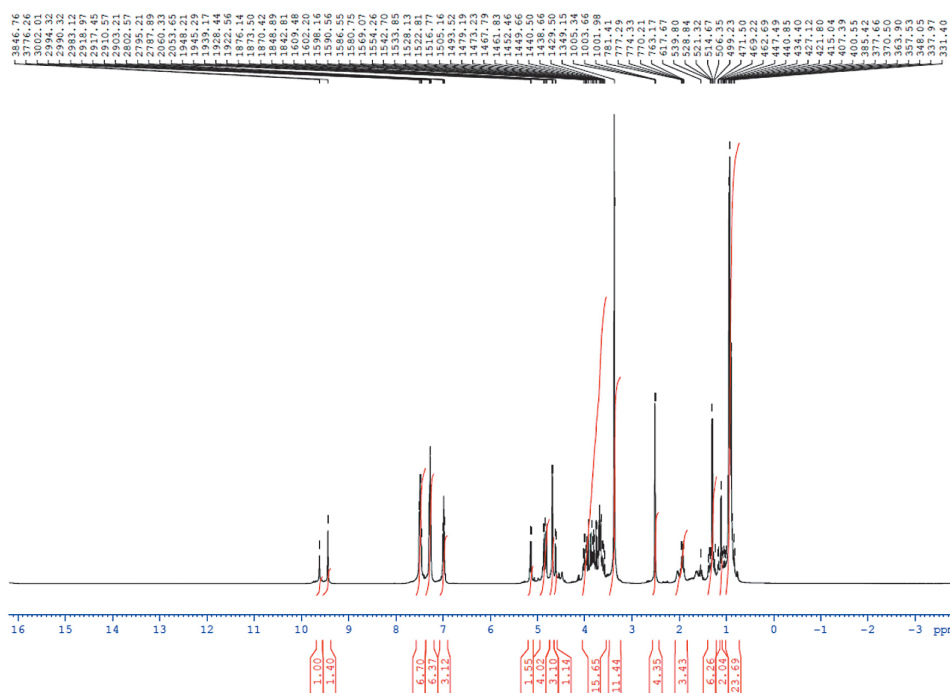


Fig. 3. 1H NMR Spectrum of (1-(5-isopropyl-1,3-dioxan-5-yl)ethyl phenyl carbamate **9** in dimethyl sulfoxide- d_6

Рис. 3. Спектр ЯМР 1H (1-(5-изопропил-1,3-диоксан-5-ил)этилфенилкарбамата **9** в диметилсульфоксиде- d_6

Antibacterial and antifungal activities of new 1,3-dioxolane and 1,3-dioxane derivatives

Антибактериальная и противогрибковая активность новых производных 1,3-диоксолана и 1,3-диоксана

Compound		Minimum inhibitory concentrations, $\mu\text{g/mL}$								
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Candida albicans</i>
1	1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
2	2	2	2	2	8	2	8	2	8	100
3	3	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
4	4	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
5	5	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
6	6	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
7	7	25	25	25	100	25	100	25	100	100
8	8	8	8	100	100	100	8	8	100	2
10	9	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
11	Ceftriaxone	0,1	0,1	0,1	1	0,1	10	0,5	0,5	–
12	Pimafucin	–	–	–	–	–	–	–	–	1

The structure-activity studies showed that 1,3-dioxolane **4**, containing chloromethyl group in the ethyl fragment, had an antimicrobial effect against gram-positive and gram-negative test cultures and a weak antifungal activity (MIC 100 $\mu\text{g/mL}$) against lower fungi *C. albicans*. Unlike 1,3-dioxolane **5** containing a hydroxymethyl group in the 4 position, 1-(5-isopropyl-1,3-dioxan-5-yl)ethanol **10** exhibits antifungal activity MIC 2 $\mu\text{g/mL}$ and a sharp decrease in antimicrobial activity against *K. pneumoniae*, *St. aureus*, *E. aerogenes* MIC 100 $\mu\text{g/mL}$. Similarly 5-acyl-5-isopropyl-1,3-dioxane **7**, containing carbonyl group in the structure, showed antimicrobial activity (MIC 25 $\mu\text{g/mL}$) against gram-negative test cultures except of *Ps. aeruginosa*. An interesting result was that the introduction of the isocyanate fragment into the 1,3-dioxane molecule (compound **9**) reduces the antibacterial and antifungal activities.

1,3-Dioxolanes **1, 3–6** at concentrations up to 100 $\mu\text{g/mL}$ did not inhibit the vital activity of the studied bacteria and lower fungi (see Table).

The obtained results show that it is promising to continue the search for new antimicrobial and antifungal

drugs in the series of 1,3-dioxacycloalkanes, the structure of which is fundamentally different from the known antibacterial drugs.

CONCLUSIONS

Nine functionally substituted 1,3-dioxacycloalkanes have been synthesized and tested as anti-microbial and antifungal agents. Among the synthesized substances, the leading compounds were found to be: 2-methyl-2-ethyl-4-chloromethyl-1,3-dioxolane had antimicrobial effect against Gram-positive and Gram-negative test cultures, 5-acyl-5-isopropyl-1,3-dioxane showed antimicrobial activity (MIC 25 $\mu\text{g/mL}$) against Gram-negative test cultures except of *Ps. Aeruginosa*, and 1-(5-isopropyl-1,3-dioxan-5-yl)ethanol exhibits antifungal activity MIC 2 $\mu\text{g/mL}$ and a sharp decrease in antimicrobial activity against *K. pneumoniae*, *St. aureus*, *E. aerogenes* MIC 100 $\mu\text{g/mL}$. In summary, the results obtained show that the search for new antimicrobial and antifungal drugs in the series of functionally substituted 1,3-dioxacycloalkanes is promising, since their structure is fundamentally different from the known antibacterial drugs.

REFERENCES

1. Maximov A.L., Nekhaev A.I., Ramazanov D.N. Ethers and acetals, promising petrochemicals from renewable sources. *Petroleum Chemistry*. 2015;55:1-21. DOI: 10.1134/S0965544115010107.
2. Oparina L.A., Kolyanov N.A., Gusarova N.K., Saprygina V.N. Oxygenate fuel additives on the basis on renewable raw materials. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018;8(1):19-34. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2018-8-1-19-34. EDN: UQKXXE.
3. Ramazanov D.N., Nekhaev A.I., Samoilov V.O., Maximov A.L., Dzhumbe A. Egorova E.V. Reaction between glycerol and acetone in the presence of ethylene glycol. *Petroleum Chemistry*. 2015;55:140-145. DOI: 10.1134/S0965544115020152.
4. Varfolomeev S.D., Vol'eva V.B., Komissarova N.L., Kurkovskaya L.N., Malkova A.V., Ovsyannikova M.N., et al. New possibilities in the synthesis of fuel oxygenates from renewable sources. *Russian Chemical Bulletin*. 2019;68:717-724. DOI: 10.1007/s11172-019-2478-3.
5. Raskil'dina G.Z., Borisova Yu.G., Spirikhin L.V., Zlitsky S.S. Synthesis and physical and chemical characteristics of isomeric 2-, 4-substituted 1,3-dioxacycloalkanes. *Chemistry and Technology of Organic Substances*. 2019;1:4-12. (In Russian). DOI: 10.54468/25876724_2019_1_4. EDN: BZCKUO.
6. Kadiev K.M., Batov A.E., Dandaev A.U., Kadieva M.Kh., Oknina N.V., Maksimov A.L. Hydrogenation processing of oil wastes in the presence of ultrafine catalysts. *Petroleum Chemistry*. 2015;55:667-672. DOI: 10.1134/S0965544115080083.
7. Raskil'dina G.Z., Sultanova R.M., Zlitsky S.S. gem-Dichlorocyclopropanes and 1,3-dioxacyclanes: synthesis based on petroleum products and use in low-tonnage chemistry. *Reviews and Advances in Chemistry*. 2023;13:15-27. DOI: 10.1134/S2634827623700150.
8. Campos J., Saniger E., Marchal J.A., Aiello S., Suarez I., Boulaiz H., et al. New medium oxacyclic O,N-acetals and related open analogues: biological activities. *Current Medicinal Chemistry*. 2005;12(12):1423-1438. DOI: 10.2174/0929867054020927.

9. Iovinella I., Mandoli A., Luceri C., D'Ambrosio M., Caputo B., Cobre P., et al. Cyclic acetals as novel long-lasting mosquito repellents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2023;71(4):2152-2159. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c05537.

10. Sedrik R., Bonjour O., Laanesoo S., Liblikas I., Pehk T., Jannasch P., et al. Chemically recyclable poly(β -thioether ester)s based on rigid spirocyclic ketal diols derived from citric acid. *Biomacromolecules*. 2022;23(6):2685-2696. DOI: 10.1021/acs.biomac.2c00452.

11. El Maatougui A., Azuaje J., Coelho A., Cano E., Yanez M., Lopez C., et al. Discovery and preliminary SAR of 5-arylidene-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones as platelet aggregation inhibitors. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*. 2012;15(7):551-554. DOI: 10.2174/138620712801619122.

12. Franchini S., Bencheva L.I., Battisti U.M., Tait A., Sorbi C., Fossa P., et al. Synthesis and biological evaluation of 1,3-dioxolane-based 5-HT_{1A} receptor agonists for CNS disorders and neuropathic pain. *Future Medicinal Chemistry*. 2018;10(18):2137-2154. DOI: 10.4155/fmc-2018-0107.

13. Zhang Q., Cao R., Liu A., Lei S., Li Y., Yang J., et al. Design, synthesis and evaluation of 2,2-dimethyl-1,3-dioxolane derivatives as human rhinovirus 3C protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2017;27(17):4061-4065. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.07.049.

14. Raskildina G.Z., Borisova Y.G., Nurlanova S.N., Bashirov I.I., Fahretidinova A.K., Purygin P.P., et al. Anticoagulation and antiaggregation activities of a number of substituted gem-dichlorocyclopropanes and 1,3-dioxacycloalkanes. *Butlerov Communications*. 2022;70(5):86-91. (In Russian). DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/22-70-5-86. EDN: SSWALS.

15. Min L.-J., Wang H., Bajsa-Hirschel J., Yu C.S., Wang B., Yao M.-M., et al. Novel dioxolane ring compounds for the management of phytopathogen diseases as ergosterol biosynthesis inhibitors: synthesis, biological activities, and molecular docking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2022;70(14):4303-4315. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c00541.

16. Khusnutdinova N.S., Sakhabutdinova G.N., Raskil'dina G.Z., Meshcheryakova S.A., Zlotsky S.S., Sultanova R.M. Synthesis and biological activity of diterpenic acid esters containing a cycloacetal fragment. *Chem-*

ChemTech. 2022;65(4):6-12. (In Russian). DOI: 10.6060/ivkkt.20226504.6516. EDN: KMZYIR.

17. Yuan L., Li Z., Zhang X., Yuan X. Crystal structure and biological activity of (3-methyl-1,5-dioxaspiro[5.5]undecan-3-yl)methanol synthesized with nanosolid superacid. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2017;17(4):2624-2627. DOI: 10.1166/jnn.2017.12701.

18. Pustyl'nyak V., Kazakova Y., Yarushkin A., Slynko N., Gulyaeva L. Effect of several analogs of 2,4,6-triphenyldioxane-1,3 on CYP2B induction in mouse liver. *Chemico-Biological Interactions*. 2011;194(2-3):134-138. DOI: 10.1016/j.cbi.2011.09.003.

19. Sekimata K., Ohnishi T., Mizutani M., Todoroki Y., Han S.Y., Uzawa J., et al. Brz220 Interacts with DWF4, a cytochrome P450 monooxygenase in brassinosteroid biosynthesis, and exerts biological activity. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*. 2008;72(1):7-12. DOI: 10.1271/bbb.70141.

20. Schmidt E.Yu., Bidusenko I.A., Ushakov I.A., Trofimov B.A. Unfolding the frontalin chemistry: a facile selective hydrogenation of 7-methylidene-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octanes, 2:2 ensembles of ketones and acetylene. *Mendeleev Communications*. 2018;28(5):513-514. DOI: 10.1016/j.mencom.2018.09.021.

21. Sapozhnikov S.V., Shtyrlin N.V., Kayumov A.R., Zamaldinova A.E., Iksanova A.G., Nikitina E.V., et al. New quaternary ammonium pyridoxine derivatives: synthesis and antibacterial activity. *Medicinal Chemistry Research*. 2017;26:3188-3202. DOI: 10.1007/s00044-017-2012-9.

22. Musin A.I., Borisova Yu.G., Raskildina G.Z., Spirikhin L.V., Sultanova R.M., Zlotsky S.S. Synthesis, structure and biological activity of 2,2,4-trisubstituted of 1,3-dioxolanes. *ChemChemTech*. 2023;66(9):20-27. (In Russian). DOI: 10.6060/ivkkt.20236609.6829. EDN: OMHWYL.

23. Gorrichon J.-P., Gaset A., Delmas M. One-step synthesis of 1,3-dioxanes from ketones and paraformaldehyde with a cation exchange resin as catalyst. *Synthesis*. 1979;3:219. DOI: 10.1055/s-1979-28628.

24. Musin A.I., Borisova Yu.G., Raskil'dina G.Z., Daminev R.R., Davletshin A.R., Zlotskii S.S. Heterogeneous catalytic reduction of substituted 5-acyl-1,3-dioxanes. *Fine Chemical Technologies*. 2022;17(3):201-209. DOI: 10.32362/2410-6593-2022-17-3-201-209. EDN: MXMOUE.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Maximov A.L., Nekhaev A.I., Ramazanov D.N. Ethers and acetals, promising petrochemicals from renewable sources // *Petroleum Chemistry*. 2015. Vol. 55. P. 1-21. DOI: 10.1134/S0965544115010107.

2. Опарина Л.А., Кольванов Н.А., Гусарова Н.К., Сапрыгина В.Н. Оксигенатные добавки к топливу на основе возобновляемого сырья // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2018. Т. 8. № 1. С. 19-34. DOI: 10.21285/2227-2925-2018-8-1-19-34. EDN: UQKXXE.

3. Ramazanov D.N., Nekhaev A.I., Samoilov V.O., Maximov A.L., Dzhumbe A., Egorova E.V. Reaction between glycerol and acetone in the presence of ethylene glycol // *Petroleum Chemistry*. 2015. Vol. 55. P. 140-145. DOI: 10.1134/S0965544115020152.

4. Varfolomeev S.D., Vol'eva V.B., Komissarova N.L., Kurkovskaya L.N., Malkova A.V., Ovsyannikova M.N., et al.

New possibilities in the synthesis of fuel oxygenates from renewable sources // *Russian Chemical Bulletin*. 2019. Vol. 68. P. 717-724. DOI: 10.1007/s11172-019-2478-3.

5. Раскильдина Г.З., Борисова Ю.Г., Спирихин Л.В., Злотский С.С. Получение и физико-химические характеристики изомерных 2-, 4-замещенных 1,3-диоксациклоалканов // *Химия и технология органических веществ*. 2019. № 1. С. 4-12. DOI: 10.54468/25876724_2019_1_4. EDN: BZCKUO.

6. Kadiev K.M., Batov A.E., Dandaev A.U., Kadieva M.Kh., Oknina N.V., Maksimov A.L. Hydrogenation processing of oil wastes in the presence of ultrafine catalysts // *Petroleum Chemistry*. 2015. Vol. 55. P. 667-672. DOI: 10.1134/S0965544115080083.

7. Raskil'dina G.Z., Sultanova R.M., Zlotsky S.S. gem-Dichlorocyclopropanes and 1,3-dioxacyclanes: synthesis based on petroleum products and use in low-tonnage

chemistry // Reviews and Advances in Chemistry. 2023. Vol. 13. P. 15–27. DOI: 10.1134/S2634827623700150.

8. Campos J., Saniger E., Marchal J.A., Aiello S., Suarez I., Boulaiz H., et al. New medium oxacyclic O,N-acetals and related open analogues: biological activities // Current Medicinal Chemistry. 2005. Vol. 12, no. 12. P. 1423–1438. DOI: 10.2174/0929867054020927.

9. Iovinella I., Mandoli A., Luceri C., D'Ambrosio M., Caputo B., Cobre P., et al. Cyclic acetals as novel long-lasting mosquito repellents // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2023. Vol. 71, no. 4. P. 2152–2159. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c05537.

10. Sedrik R., Bonjour O., Laanesoo S., Liblikas I., Pehk T., Jannasch P., et al. Chemically recyclable poly(β -thioether ester)s based on rigid spirocyclic ketal diols derived from citric acid // Biomacromolecules. 2022. Vol. 23, no. 6. P. 2685–2696. DOI: 10.1021/acs.biomac.2c00452.

11. El Maatougui A., Azuaje J., Coelho A., Cano E., Yanez M., Lopez C., et al. Discovery and preliminary SAR of 5-arylidene-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones as platelet aggregation inhibitors // Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening. 2012. Vol. 15, no. 7. P. 551–554. DOI: 10.2174/138620712801619122.

12. Franchini S., Bencheva L.I., Battisti U.M., Tait A., Sorbi C., Fossa P., et al. Synthesis and biological evaluation of 1,3-dioxolane-based 5-HT_{1A} receptor agonists for CNS disorders and neuropathic pain // Future Medicinal Chemistry. 2018. Vol. 10, no. 18. P. 2137–2154. DOI: 10.4155/fmc-2018-0107.

13. Zhang Q., Cao R., Liu A., Lei S., Li Y., Yang J., et al. Design, synthesis and evaluation of 2,2-dimethyl-1,3-dioxolane derivatives as human rhinovirus 3C protease inhibitors // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2017. Vol. 27, no. 17. P. 4061–4065. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.07.049.

14. Раскильдина Г.З., Борисова Ю.Г., Нурланова С.Н., Баширов И.И., Фахретдинова А.К., Пурыгин П.П. [и др.]. Антикоагуляционная и антиагрегационная активности ряда замещенных гем-дихлорциклопропанов и 1,3-диоксациклоалканов // Бутлеровские сообщения. 2022. Т. 70. N 5. С. 86–91. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/22-70-5-86. EDN: SSWALS.

15. Min L.-J., Wang H., Bajsa-Hirschel J., Yu C.S., Wang B., Yao M.-M., et al. Novel dioxolane ring compounds for the management of phytopathogen diseases as ergosterol biosynthesis inhibitors: synthesis, biological activities, and molecular docking // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2022. Vol. 70, no. 14. P. 4303–4315. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c00541.

16. Хуснутдинова Н.С., Сахабутдинова Г.Н., Раскильдина Г.З., Мещерякова С.А., Злотский С.С., Султанова Р.М.

Синтез и цитотоксическая активность сложных эфиров дитерпеновых кислот, содержащих циклоацетальный фрагмент // Известия высших учебных заведений. Серия Химия и химическая технология. 2022. Т. 65. N 4. С. 6–12. DOI: 10.6060/ivkkt.20226504.6516. EDN: KMZYIR.

17. Yuan L., Li Z., Zhang X., Yuan X. Crystal structure and biological activity of (3-methyl-1,5-dioxaspiro[5.5]undecan-3-yl)methanol synthesized with nanosolid superacid // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2017. Vol. 17, no. 4. P. 2624–2627. DOI: 10.1166/jnn.2017.12701.

18. Pustyl'nyak V., Kazakova Y., Yarushkin A., Slynko N., Gulyaeva L. Effect of several analogs of 2,4,6-triphenyldioxane-1,3 on CYP2B induction in mouse liver // Chemico-Biological Interactions. 2011. Vol. 194, no. 2-3. P. 134–138. DOI: 10.1016/j.cbi.2011.09.003.

19. Sekimata K., Ohnishi T., Mizutani M., Todoroki Y., Han S.Y., Uzawa J., et al. Brz220 Interacts with DWF4, a cytochrome P450 monooxygenase in brassinosteroid biosynthesis, and exerts biological activity // Bioscience, Biotechnology & Biochemistry. 2008. Vol. 72, no. 1. P. 7–12. DOI: 10.1271/bbb.70141.

20. Schmidt E.Yu., Bidusenko I.A., Ushakov I.A., Trofimov B.A. Unfolding the frontalin chemistry: a facile selective hydrogenation of 7-methyldiene-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octanes, 2:2 ensembles of ketones and acetylene // Mendeleev Communications. 2018. Vol. 28, no. 5. P. 513–514. DOI: 10.1016/j.mencom.2018.09.021.

21. Sapozhnikov S.V., Shtyrlin N.V., Kayumov A.R., Zamaldinova A.E., Iksanova A.G., Nikitina E.V., et al. New quaternary ammonium pyridoxine derivatives: synthesis and antibacterial activity // Medicinal Chemistry Research. 2017. Vol. 26. P. 3188–3202. DOI: 10.1007/s00044-017-2012-9.

22. Мусин А.И., Борисова Ю.Г., Раскильдина Г.З., Спирихин Л.В., Султанова Р.М., Злотский С.С. Синтез, строение и биологическая активность 2,2,4-тризамещенных 1,3-диоксоланов // Известия высших учебных заведений. Серия Химия и химическая технология. 2023. Т. 66. N 9. С. 20–27. DOI: 10.6060/ivkkt.20236609.6829. EDN: OMHWYL.

23. Gorrichon J.-P., Gaset A., Delmas M. One-step synthesis of 1,3-dioxanes from ketones and paraformaldehyde with a cation exchange resin as catalyst // Synthesis. 1979. Vol. 3. P. 219. DOI: 10.1055/s-1979-28628.

24. Мусин А.И., Борисова Ю.Г., Раскильдина Г.З., Даминев Р.Р., Давлетшин А.Р., Злотский С.С. Гетерогенно-каталитическое восстановление замещенных 5-ацил-1,3-диоксанов // Тонкие химические технологии. 2022. Т. 17. N 3. С. 201–209. DOI: 10.32362/2410-6593-2022-17-3-201-209. EDN: MXMOUE.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yulianna G. Borisova,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Ufa State Petroleum Technological University,
1, Kosmonavtov St., Ufa, 450064,
Russian Federation,
✉ yulianna_borisova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6452-9454>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Борисова Юлианна Геннадьевна,
к.х.н., доцент,
Уфимский государственный нефтяной
технический университет,
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,
Российская Федерация,
✉ yulianna_borisova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6452-9454>

Aidar K. Bulgakov,

Dr. Sci. (Medicine), Professor, Professor,
Bashkir State Medical University,
3, Lenin St., Ufa, 450008,
Russian Federation,
ba-mik@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-5145-6380>

Nailya S. Khusnutdinova,

Assistant,
Bashkir State Medical University,
3, Lenin St., Ufa, 450008,
Russian Federation,
neilyhusnutdinova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0460-8382>

Gul'nara Z. Raskil'dina,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Professor,
Ufa State Petroleum Technological University,
1, Kosmonavtov St., Ufa, 450064,
Russian Federation,
graskildina444@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9770-5434>

Semen S. Zlotskii,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Head of the Department,
Ufa State Petroleum Technological University,
1, Kosmonavtov St., Ufa, 450064,
Russian Federation,
nocturne@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6365-5010>

Aigul' A. Bulgakova,

Assistant,
Bashkir State Medical University,
3, Lenin St., Ufa, 450008,
Russian Federation,
aigulbulbul@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0000-5298-9621>

Svetlana A. Meshcheryakova,

Dr. Sci. (Pharmacy), Professor,
Head of the Department,
Bashkir State Medical University,
3, Lenin St., Ufa, 450008,
Russian Federation,
svetlanama@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0501-6474>

Rimma M. Sultanova,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Professor,
Ufa State Petroleum Technological University,
1, Kosmonavtov St., Ufa, 450064,
Russian Federation,
rimmams@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6719-2359>

Булгаков Айдар Казбекович,

д.м.н., профессор, профессор,
Башкирский государственный
медицинский университет,
450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
Российская Федерация,
ba-mik@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-5145-6380>

Хуснутдинова Наиля Сабитовна,

ассистент кафедры,
Башкирский государственный
медицинский университет,
450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
Российская Федерация,
neilyhusnutdinova@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0460-8382>

Раскильдина Гульнара Зиннуровна,

д.х.н., профессор, профессор,
Уфимский государственный нефтяной
технический университет,
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,
Российская Федерация,
graskildina444@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9770-5434>

Злотский Семён Соломонович,

д.х.н., профессор, заведующий кафедрой,
Уфимский государственный нефтяной
технический университет,
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,
Российская Федерация,
nocturne@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6365-5010>

Булгакова Айгуль Айдаровна,

ассистент кафедры,
Башкирский государственный
медицинский университет,
450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
Российская Федерация,
aigulbulbul@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0000-5298-9621>

Мещерякова Светлана Алексеевна,

д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой,
Башкирский государственный
медицинский университет,
450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
Российская Федерация,
svetlanama@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0501-6474>

Султанова Римма Марсельевна,

д.х.н., профессор, профессор,
Уфимский государственный нефтяной
технический университет,
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,
Российская Федерация,
rimmams@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6719-2359>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

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

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

Information about the article

*The article was submitted 06.09.2024.
Approved after reviewing 20.11.2024.
Accepted for publication 30.11.2024.*

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

*Поступила в редакцию 06.09.2024.
Одобрена после рецензирования 20.11.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.*



Evaluation of antifungal and antioxidant activities of extracts prepared from earthworm (*Perionyx excavatus*) using different solvents

Nguyen T. Dung*, Pham H. Son*, Nguyen T.N. Trinh*, Vo N.T. Thao*,
Bui L.K. Tu*, Le Q. Luan*, Bui B. Thinh*✉, Le V. Hai*,**✉

*Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Vietnam

**Phan Chau Trinh University, Quang Nam, Vietnam

Abstract. This study evaluated the antifungal and antioxidant activities of earthworm (*Perionyx excavatus*) powder extracts using different solvents including 80% ethanol, 50% ethanol, and distilled water. The extraction efficiencies ranged from 18.5 to 21.2%, while total protein contents ranged from 64.8 to 67.5%. Notably, the aqueous extract exhibited the highest values in both extraction efficiency and total protein content. Thin-layer chromatography analysis revealed the presence of amino acids and peptides with R_f values ranging from 0.42 to 0.65. Fourier-transform infrared spectroscopy spectra displayed characteristic peaks associated with protein structures. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis indicated protein compositions primarily below 50 kDa molecular weight in the extracts, particularly with the 80% ethanol extract predominantly consisting of proteins below 30 kDa. Antifungal tests against *Candida albicans* demonstrated the highest efficacy with 80% ethanol extract, exhibiting an inhibition zone diameter of 13.3 mm and a minimum inhibitory concentration of 75 mg/mL. Additionally, the extracts showed DPPH and ABTS radical scavenging activities, with 80% ethanol extract displaying the highest antioxidant potential with IC_{50} values of 231.3 μ g/mL for DPPH assay and 208.9 μ g/mL for ABTS assay. In conclusion, earthworm powder extracts exhibited significant biological activities, rendering them promising candidates for pharmaceutical and cosmetic applications.

Keywords: Earthworm, *Perionyx excavatus*, *Candida albicans*, DPPH, ABTS

Funding. Department of Science and Technology of Ho Chi Minh City, Vietnam funded this research (Project no. 05/2023/HĐ-QKHCN).

For citation: Dung N.T., Son P.H., Trinh N.T.N., Thao V.N.T., Tu B.L.K., Luan L.Q., et al. Evaluation of antifungal and antioxidant activities of extracts prepared from earthworm (*Perionyx excavatus*) using different solvents. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4)462-471. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.953. EDN: HZYTZA.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 592

EDN: HZYTZA

DOI: 10.21285/achb.953

Оценка противогрибковой и антиоксидантной активности экстрактов, полученных из дождевого червя (*Perionyx excavatus*) с использованием различных растворителей

Н.Т. Дунг*, Ф.Х. Сон*, Н.Т.Н. Тринь*, В.Н.Т. Тхао*,
Б.Л.К. Ту*, Л.К. Луан*, Б.Б. Тхинь*✉, Л.В. Хай*,**✉

*Биотехнологический центр города Хошимина, Хошимин, Вьетнам

**Университет Фан Чау Тринь, Куанг Нам, Вьетнам

Аннотация. В данном исследовании были оценены противогрибковые и антиоксидантные активности экстрактов из порошка дождевого червя (*Perionyx excavatus*), приготовленных с использованием различных растворителей,

© Dung N.T., Son P.H., Trinh N.T.N., Thao V.N.T., Tu B.L.K., Luan L.Q., Thinh B.B., Hai L.V., 2024

включая 80%-й этанол, 50%-й этанол и дистиллированную воду. Эффективность экстракции варьировалась от 18,5 до 21,2%, в то время как содержание общего белка колебалось от 64,8 до 67,5%. Примечательно, что водный экстракт продемонстрировал наивысшие значения как по эффективности экстракции, так и по содержанию белка. Анализ методом тонкослойной хроматографии выявил присутствие аминокислот и пептидов с R_f -значениями от 0,42 до 0,65. Спектры инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье показали характерные пики, связанные со структурой белков. Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия указал на наличие белков преимущественно с молекулярной массой ниже 50 кДа в экстрактах, особенно в экстракте с 80%-м этанолом, который в основном содержал белки с молекулярной массой ниже 30 кДа. Противогрибковые тесты против *Candida albicans* показали наивысшую эффективность у экстракта с 80%-м этанолом с диаметром зоны ингибирования 13,3 мм и минимальной ингибирующей концентрацией 75 мг/мл. Кроме того, экстракты продемонстрировали активность в отношении улавливания радикалов DPPH и ABTS, причем экстракт с 80%-м этанолом показал наивысший антиоксидантный потенциал со значениями IC_{50} 231,3 мкг/мл для DPPH и 208,9 мкг/мл для ABTS. В заключение необходимо отметить, что экстракты из порошка дождевого червя проявили значительную биологическую активность, что делает их перспективными кандидатами для применения в фармацевтике и косметологии.

Ключевые слова: дождевой червь, *Perionyx excavatus*, *Candida albicans*, DPPH, ABTS

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Департамента науки и технологий г. Хошимина, Вьетнам (проект № 05/2023/HD-QKHCN).

Для цитирования: Дунг Н.Т., Сон Ф.Х., Тринь Н.Т.Н., Тхао В.Н.Т., Ту Б.Л.К., Луан Л.К. [и др.]. Оценка противогрибковой и антиоксидантной активности экстрактов, полученных из дождевого червя (*Perionyx excavatus*) с использованием различных растворителей // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 462–471. DOI: 10.21285/achb.953. EDN: HZYTA.

INTRODUCTION

In Vietnam, a rich diversity of flora and fauna has long been utilized in traditional medicine to treat various ailments, owing to their inherent therapeutic properties¹ [1]. Despite remarkable advancements in modern healthcare, a significant portion of the population continues to rely on traditional remedies derived from plants and animals¹ [2]. As interest grows in integrating traditional and modern medicine, there is a burgeoning trend in exploring the beneficial properties of natural products. Many natural sources have demonstrated significant biological activities, including antimicrobial and antioxidant properties, crucial for combating infectious diseases and oxidative stress-related disorders [3]. Moreover, natural products often exhibit fewer adverse effects compared to synthetic alternatives [4]. Of particular interest is the study of earthworms, a traditional medicinal resource in Vietnam, which has garnered attention for its potential therapeutic applications.

Earthworms are invertebrates that have been widely used medicinally in traditional medicine for centuries [5]. Extraction and utilization of bioactive compounds from earthworms have been practiced globally, particularly in Asian countries such as India, South Korea, China, and Vietnam [5, 6]. Earthworms are believed to enhance health and prevent various diseases. Earthworm proteins possess high nutritional value and can serve as high-quality animal-origin protein supplements for nutrition enrichment [7, 8]. Furthermore, earthworm species such as *Lampito*, *Eudrilus*, *Perionyx*, *Eisenia*, and *Metaphire* have demonstrated various preventive and therapeutic effects. Numerous studies have indicated that earthworm extracts contain a plethora of bioactive molecules exhibiting diverse biological functions, including antimicrobial [9–13], wound healing promotion [14, 15], anti-inflammatory

[16–18], and antioxidant activities [19–21]. They have shown inhibitory effects on cancer cells such as MCF-7 breast cancer cells, prostate cancer cells, and colorectal cancer cells [22–25].

Perionyx excavatus is one of the most common earthworm species in Vietnam, particularly in southern provinces such as Ho Chi Minh City, Dong Nai, and Ninh Thuan [26]. This species possesses both nutritional value and high biological activity [27]. However, research on the antimicrobial and antioxidant activities of this earthworm species in Vietnam remains relatively limited. Therefore, in this study, we conducted extractions from *P. excavatus* using different solvents and evaluated their antifungal and antioxidant activities, laying the groundwork for the application of earthworms in the pharmaceutical and cosmetic industries.

MATERIALS AND METHODS

Earthworm samples. Living earthworms (*P. excavatus*), aged 7–8 weeks, were collected from a farm located in Cu Chi district, Ho Chi Minh City, Vietnam. Upon collection, they were promptly transported to the Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Vietnam. The earthworms underwent processing following the method outlined by Azmi et al. [28], with some modifications. Initially, the earthworms were washed under running water to clean the dirt from the body surface. Subsequently, they were immersed in 1.0% NaCl solution for 15 min, followed by a 0.3% citric acid solution for 20 min. Following this treatment, the earthworms were freeze-dried to yield earthworm powder, which was then stored at 40 °C.

Preparation of ethanol extract (E80 and E50). 30 g of earthworm powder was placed into a 500 mL beaker and mixed with either 300 mL of 80% ethanol (E80) or 50% ethanol (E50) at a 1:10 (w/v). The mixture was stirred at

¹ Nguyen D.N.V., Nguyen T. An overview of the use of plants and animals in traditional medicine systems in Viet Nam: a Traffic Southeast Asia report. Ha Noi: Traffic Southeast Asia, 2008. 96 p.

room temperature for 8 h and filtered through the Whatman filter paper. The ethanol solvent was then evaporated. The resulting solutions were combined with 400 mL of hexane and stirred for 60 min at room temperature. The hexane solvent was removed, and the mixture was filtered through a 0.22 μ m membrane, and then freeze-dried to obtain the extract powder (E80 and E50).

Preparation of aqueous extract (W). 20 g of earthworm powder was placed into a 500 mL beaker and mixed with 200 mL of distilled water. The mixture was shaken vigorously and broken using an ultrasonic device (Sonicator-Q700) with intensity fluctuating at 50% for 10 min. Subsequently, the sample was heated to boiling for 60 min on a stirrer and filtered using Whatman filter paper. The resulting filtrate was combined with 300 mL of hexane solvent and stirred for an additional 60 min. After removing the hexane, the solution was filtered through a 0.22 μ m membrane. The filtered solution was then freeze-dried to obtain the extract powder (W).

Determination of extraction efficiency. The extraction efficiency *EE* of each earthworm extract (E80, E50, and W) was calculated based on the formula: % *EE* = $W_1/W_2 \times 100$, where W_1 is the weight of the obtained extract powder, g, and W_2 is the weight of the sample initial, g.

Determination of protein content. The total protein content in the earthworm extracts was assessed using the Kjeldahl method [29]. 1 g of each earthworm extract (E80, E50, and W) was added to a Kjeldahl digestion flask containing 25 mL of concentrated H_2SO_4 , along with a catalyst (9 g of K_2SO_4 and 1 g of $CuSO_4 \cdot 5H_2O$). After 2.5 h of digestion in a unit with electrical heat and fume removal, the mixture was allowed to cool to room temperature. Subsequently, 80 mL of NaOH base was added to the flask. Following distillation, the collected ammonia underwent titration with a standardized solution of HCl to determine its concentration. The nitrogen content in the sample was then calculated based on the volume and concentration of the acid used in the titration. Since proteins typically contain about 16% nitrogen by weight, the total protein content of the sample was calculated using a conversion factor of 6.25.

Thin-layer chromatography analysis. The earthworm extracts (E80, E50, and W) were subjected to thin-layer chromatography (TLC) analysis by dissolving them in ethanol and applying them onto a TLC plate measuring 7×10 cm, coated with silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany). A mobile phase consisting of a mixture of *n*-butanol, acetic acid, and water in the ratio 5:1:4 was used for chromatographic separation. Subsequently, the TLC plate was sprayed with a solution of ninhydrin (1.5 g ninhydrin in 100 mL ethanol) and then dried at 45 °C for 10 min. Observation of the resulting chromatogram allowed for the determination of both the color and the migration coefficient R_f of the substance traces.

Fourier-transform infrared spectroscopy analysis. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis was conducted using a method outlined by Ramya et al. [30]. A mixture comprising 10 mg of earthworm extracts (E80, E50, and W) and 100 mg of dried potassium bromide (KBr) was prepared. This mixture was then pelletized under compression at a diameter of 3 mm and a thickness of 1 mm. Subsequently, the absorbance spectra were obtained using a Bio-Rad FTIR-40-model spectrometer

from the USA. FTIR analysis relies on the principle that different components within the sample absorb infrared radiation at distinct frequencies.

Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis analysis. The molecular weights of earthworm proteins were determined using sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to the method outlined by Hua et al. [31]. Initially, the earthworm protein samples (E80, E50, and W) were dissolved in a buffer solution consisting of 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 2% 2-mercaptoethanol. Following dissolution, the samples underwent centrifugation at 5000 rpm for 5 min. Subsequently, the protein sample was mixed in a 1:1 ratio (v/v) with a buffer solution containing 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, glycerol at 100%, bromophenol blue, and 2% 2-mercaptoethanol. This mixture was then boiled for 5 min to denature the proteins and ensure uniform binding of SDS. For the electrophoretic separation of proteins, a 16% polyacrylamide resolving gel was prepared, topped by a 5% stacking gel. The prepared protein samples were loaded onto the gel and subjected to electrophoresis under denaturing conditions. Following electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250, allowing visualization of the separated protein bands. Excessive stain was removed by destaining the gel in a solution containing 7% acetic acid and 25% methanol until protein bands became clearly visible against the destained background.

Antifungal assay. The antifungal activity of earthworm extracts (E80, E50, and W) against *Candida albicans* ATCC 10231 was assessed using the agar well diffusion method, as described by Bhorgin and Uma [12], with some modifications. *C. albicans* ATCC 10231 was provided by the Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Vietnam. Initially, *C. albicans* were inoculated onto Mueller-Hinton Agar (MHA) plates with a concentration of 10^6 CFU/mL, and incubated at 37 °C for 48 h. Diluted earthworm extracts were dispensed into wells on the agar plates. Distilled water served as the negative control, while gentamicin was employed as the positive control. Following incubation at 37 °C for 24 h, the inhibition zones were measured to evaluate antifungal activity.

Furthermore, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the earthworm extracts (E80, E50, and W) was determined by a broth microdilution assay using sterile 96-well flat-bottom microtiter plates as described by Thin et al. [32]. Initially, *C. albicans* was cultured in Tryptic Soy Broth (TSB) at 37 °C for 24 h. Subsequently, the culture was diluted to a concentration of 10^6 CFU/mL using Mueller-Hinton Broth (MHB) via the McFarland method. 50 μ L of the earthworm extracts at varying concentrations were mixed with an equal volume of fungal suspension in each well and incubated at 35 °C for 24 h. Following this, 30 μ L of 0.02% resazurin was added to each well and further incubated at 35 °C for 30 min. The MIC was determined as the lowest concentration of the extract at which the resazurin reagent did not turn pink, indicating inhibition of fungal growth.

Antioxidant assay. The antioxidant activity of earthworm extracts (E80, E50, and W) was assessed through DPPH and ABTS methods, following established protocols [33, 34]. For the DPPH assay, various concentrations of

earthworm extracts were prepared in methanol. Each sample (0.9 mL) was mixed with 4 mL of 0.1 mM DPPH solution in methanol, followed by incubation at 25 °C for 30 min in the dark. Absorbances were then measured at 517 nm using a microplate reader (VersaMax, Molecular Devices). Vitamin C served as a positive control. The percentage of DPPH radical-scavenging activity was calculated using the formula: % inhibition = $(1 - A_t/A_c) \times 100$, where A_c represents the absorbance of the control sample and A_t represents the absorbance of the test samples.

In the ABTS assay, the ABTS radical cation was prepared by reacting ABTS solution (7 mM) in methanol with potassium persulfate (2.45 mM) at a 1:1 ratio. The resulting ABTS stock was left in the dark at 24 °C for 16 h before use. This stock solution was then diluted with methanol to achieve an absorbance of 0.70 (± 0.02) at 734 nm. Earthworm extracts, dissolved in methanol at various concentrations, were mixed with the ABTS stock solution (5 mL) and incubated in the dark for 15 min. Absorbance was measured at 734 nm using a microplate reader (VersaMax, Molecular Devices). Vitamin C was used as the positive control. The percentage of ABTS radical scavenging activity was calculated similarly to the DPPH assay.

The IC_{50} value, representing the concentration of the sample causing a 50% reduction in the initial DPPH or ABTS concentration, was determined from the concentration curve of the test extract against the percentage of radical scavenging inhibition obtained through linear regression analysis.

Statistical analysis. All analyses were carried out in triplicate, and the results were calculated as the mean $\pm$ standard deviation (SD) using Microsoft Excel 2016.

RESULTS

Extraction efficiency and total protein content of earthworm extracts. The extraction efficiency and total protein content of earthworm powder extracts using different solvents were evaluated. As shown in Table 1, the extraction efficiencies of the three samples ranged from 18.5 to 21.2%, while the total protein contents ranged from 64.8 to 67.5%. The highest extraction efficiency was observed with an aqueous extract, yielding 21.2%, while the lowest efficiency was obtained with 80% ethanol extract at 18.5%. Similarly, regarding protein content, the highest percentage was detected in the aqueous extract (67.5%), followed closely by the 50% ethanol extract (64.8%), and the lowest was observed in the 80% ethanol extract (66.8%).

Table 1. Extraction efficiency and total protein content of extracts prepared from earthworm (*Perionyx excavatus*) using different solvents

Таблица 1. Эффективность экстракции и общее содержание белка в экстрактах, приготовленных из дождевого червя (*Perionyx excavatus*) с использованием различных растворителей

Sample extract	Extraction efficiency, %	Total protein content, %
E80	18.5 $\pm$ 1.7	66.8 $\pm$ 0.35
E50	19.7 $\pm$ 1.1	64.8 $\pm$ 0.91
W	21.2 $\pm$ 1.2	67.5 $\pm$ 0.66

Note. Results are means of three measurements $\pm$ standard deviation ($\pm$ SD).

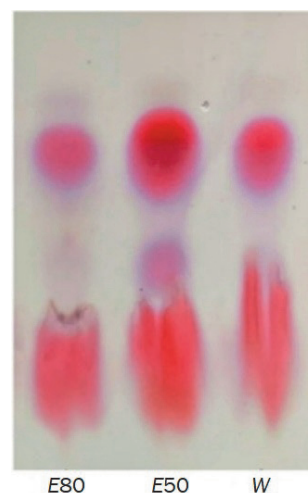


Fig. 1. Thin-layer chromatography of extracts prepared from earthworm (*Perionyx excavatus*) using different solvents

Рис. 1. Тонкослойная хроматография экстрактов, полученных из дождевого червя (*Perionyx excavatus*) с использованием различных растворителей

TLC analysis of earthworm extracts. TLC results of earthworm powder extracts using different solvents are presented in Fig. 1. Pinkish-purple spots with R_f values ranging from 0.42 to 0.65 on the TLC plate indicated the presence of amino acids and peptides.

Fourier-transform infrared spectroscopy analysis of earthworm extracts. FTIR spectroscopy analysis of earthworm powder extracts using different solvents revealed distinctive peaks associated with proteins (Fig. 2). These included characteristic absorption bands corresponding to various protein functional groups. Notably, peaks at 3400 cm^{-1} were attributed to NH group valence oscillations, indicative of peptide bonds. The presence of proteinaceous materials was further supported by the absorption band at 1643 cm^{-1} , corresponding to amide I oscillation. Oscillations within the amide II region (1407–1514 cm^{-1}) were primarily attributed to valence oscillations of C-N and C=O groups, along with contributions from other functional groups such as C≡N and CCN. The spectra also revealed the presence of amide III within the range of 1049–1218 cm^{-1} , indicating protein structures through N-H bending oscillations and deformations of C-H bonds. Additionally, absorption bands at 513–649 cm^{-1} were attributed to C=O bend oscillations outside the plane, further supporting the presence of protein components. Overall, the FTIR spectra confirmed the presence of characteristic peaks associated with protein amides I, II, and III in the earthworm powder extracts.

Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis analysis of earthworm extracts. Based on the SDS-PAGE analysis of proteins in earthworm powder extract using different solvents, the results revealed distinct patterns in the protein composition (Fig. 3). In general, proteins present in extracts from earthworm powder mainly included fractions with molecular weights below 50 kDa. In particular, the extraction process using 80% ethanol solvent mainly resulted in proteins with molecular weights below 30 kDa.

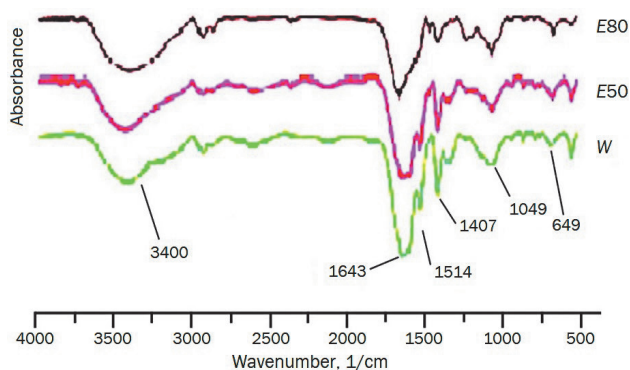


Fig. 2. Fourier-transform infrared spectra of extracts prepared from earthworm (*Perionyx excavatus*) using different solvents

Рис. 2. Инфракрасные Фурье-спектры экстрактов, полученных из дождевого червя (*Perionyx excavatus*) с использованием различных растворителей

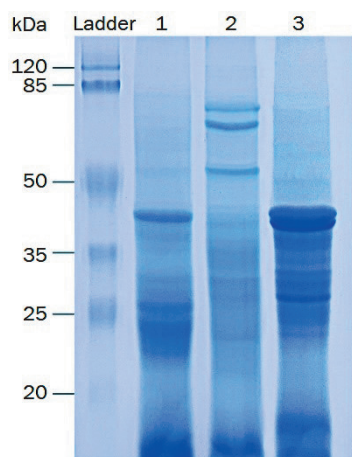


Fig. 3. Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis analysis of extracts prepared from earthworm (*Perionyx excavatus*) using different solvents: 1 – 50% ethanol extract; 2 – aqueous extract; 3 – 80% ethanol extract

Рис. 3. Выполненный при помощи электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия анализ экстрактов, полученных из дождевого червя (*Perionyx excavatus*) с использованием различных растворителей: 1 – 50%-й экстракт этанола; 2 – водный экстракт; 3 – 80%-й экстракт этанола

Antifungal activity of earthworm extracts. The antifungal activity of earthworm powder extracts using different solvents against *C. albicans* is presented in Table 2. For the agar well diffusion assay, the 80% ethanol extract exhibited the highest efficacy, producing a maximum inhibition zone diameter of 13.3 ± 1.50 mm. Following this, the 50% ethanol extract showed moderate activity with a maximum inhibition zone diameter of 6.3 ± 0.28 mm, while the aqueous extract exhibited the lowest efficacy with a maximum inhibition zone diameter of 5.3 ± 0.25 mm (Fig. 4). Additionally, the MIC data revealed the inhibitory effect of earthworm powder extracts on *C. albicans* growth, with MIC values of 75 mg/mL for 80% ethanol extract, 150 mg/mL for 50% ethanol extract, and 250 mg/mL for aqueous extract (see Table 2).

Table 2. Antifungal activity of extracts prepared from earthworm (*Perionyx excavatus*) using different solvents

Таблица 2. Противогрибковая активность экстрактов, полученных из дождевого червя (*Perionyx excavatus*) с использованием различных растворителей

Fungal strain	E80	E50	W	Gentamicin
<i>Candida albicans</i>	Diameter of inhibition zones, mm			
	13.3 ± 1.50	6.3 ± 0.28	5.3 ± 0.25	20.6 ± 2.08
	Value of the minimum inhibitory concentration, mg/mL			
	75	150	250	–

Note. Results are means of three measurements $\pm$ SD

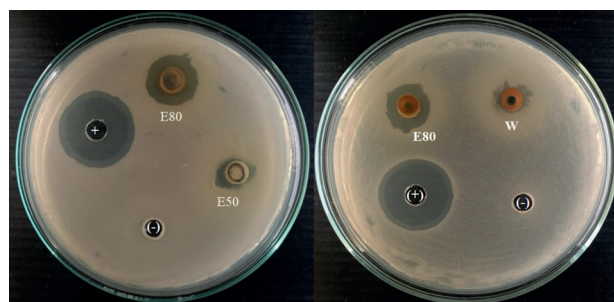


Fig. 4. Antifungal effect of extracts prepared from earthworm (*Perionyx excavatus*) against *Candida albicans* using the agar well diffusion method

Рис. 4. Противогрибковая активность экстрактов, приготовленных из дождевого червя (*Perionyx excavatus*), по отношению к *Candida albicans*, выявленная методом луночной диффузии в агаре

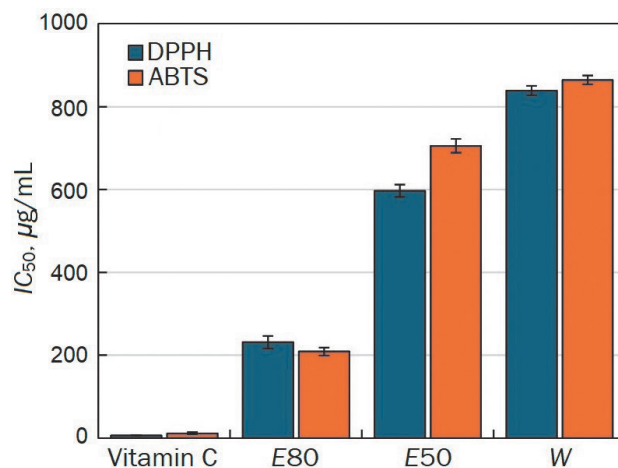


Fig. 5. Antioxidant activity (DPPH and ABTS) of extracts prepared from earthworm (*Perionyx excavatus*) using different solvents (results are means of three measurements $\pm$ SD)

Рис. 5. Антиоксидантная активность (DPPH и ABTS) экстрактов, приготовленных из дождевого червя (*Perionyx excavatus*) с использованием различных растворителей (результаты представляют собой среднее значение трех измерений $\pm$ SD)

Antioxidant activity of earthworm extracts. The results of the DPPH and ABTS scavenging activity of earthworm

powder extracts using different solvents are shown in Fig. 5. The IC_{50} values for inhibiting the DPPH radical were found to be $231.3 \pm 15.1 \mu\text{g/mL}$ for the 80% ethanol extract, $597.1 \pm 14.9 \mu\text{g/mL}$ for the 50% ethanol extract, and $838.7 \pm 11.6 \mu\text{g/mL}$ for the aqueous extract. In terms of ABTS free radical scavenging activity, the 80% ethanol extract showed an IC_{50} value of $208.9 \pm 9.6 \mu\text{g/mL}$, while the aqueous extract exhibited an IC_{50} value of $864.5 \pm 10.6 \mu\text{g/mL}$, which was higher than the IC_{50} value of $705.5 \pm 16.5 \mu\text{g/mL}$ observed for the 50% ethanol extract. As a positive control, Vitamin C demonstrated significant antioxidant activity with IC_{50} values of $6.1 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ for the DPPH assay and $11.7 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$ for the ABTS assay.

DISCUSSION

In recent years, there has been significant attention on researching the biological activity of natural products for potential applications across various fields [4]. This interest stems from the recognition of the vast chemical diversity present in natural sources, offering a rich repository of potentially bioactive compounds [35]. In this study, we focused on extracting earthworm (*P. excavatus*) using different solvents: 80% ethanol, 50% ethanol, and distilled water. Our results indicate that distilled water as a solvent yielded the highest extraction efficiency at 21.2% (see Table 1). This may be because water is a polar solvent, which facilitates the dissolution of polar compounds present in earthworm powders [36]. Many bioactive compounds, such as phenolics, flavonoids, and polysaccharides, are hydrophilic and thus more readily soluble in water. On the other hand, ethanol, while also capable of dissolving polar compounds, may not be as efficient as water due to its partial non-polar nature [37]. This observation underscores the importance of solvent selection in optimizing extraction protocols for natural products. Previous studies have similarly demonstrated that extraction efficiency is influenced by various factors, among which the solvent plays a critical role [38, 39]. Factors such as solvent polarity, viscosity, and ability to disrupt cellular structures can all impact extraction efficiency [37].

Earthworms are known to be rich sources of protein, making their quantification crucial for evaluating their nutritional composition and assessing their suitability for different purposes [7]. In this study, we found that the total protein content of earthworm extracts varied depending on the solvent used for extraction, ranging from 64.8 to 67.5% (see Table 1). This variability underscores the importance of solvent selection in maximizing protein yield from earthworm tissues. Moreover, our results indicate that aqueous extraction yielded the highest total protein content (67.5%) among the solvents tested. As emphasized above, the higher protein content obtained with distilled water as a solvent can be since water is a polar solvent, which is particularly effective in the extraction of polar and hydrophilic compounds such as proteins [36]. The affinity of water molecules for protein molecules facilitates their solubilization and extraction from earthworm tissues. In contrast, ethanol, while capable of extracting proteins, may not be as efficient due to differences in solubility and selectivity [37]. Particularly at higher concentrations, ethanol may precipitate proteins or interfere with their solubility, resulting in lower overall protein extraction efficiency [37].

Solvent effects on the total protein content of extracts have also been reported previously [40, 41].

The combination of TLC, FTIR, and SDS-PAGE analyses provided comprehensive confirmation of the presence of proteins in the earthworm extracts obtained using different solvents. TLC analysis revealed pinkish-purple spots with R_f values ranging from 0.42 to 0.65, indicative of the presence of amino acids and peptides, fundamental components of proteins (see Fig. 1). This aligns with previous studies demonstrating that R_f values in the range of 0.2 to 0.8 correspond to amino acids and peptides [42]. FTIR spectroscopy further supported protein identification by showing characteristic peaks corresponding to amides I, II, and III in the earthworm extracts (see Fig. 2). These amide peaks are well-established indicators of protein presence in FTIR spectra, closely related to protein structure and conformation [30, 43]. Moreover, SDS-PAGE analysis confirmed the presence of proteins in the earthworm extracts and provided insights into their molecular weights. Specifically, proteins with molecular weights less than 50 kDa were observed, with the 80% ethanol extract predominantly containing proteins with molecular weights below 30 kDa (see Fig. 3). The predominance of low molecular weight proteins (<30 kDa) in the 80% ethanol extract can be due to ethanol, particularly at higher concentrations, which may preferentially solubilize smaller proteins or peptide fragments over larger ones [37, 44]. This selective solubilization could result from differences in protein denaturation, solubility, and interactions with the solvent environment. Moreover, the presence of low molecular weight proteins in earthworm extracts aligns with findings from Tram et al. [45], who documented protein molecular weights spanning from 14.4 kDa to 116 kDa in earthworms, with only proteins below 30 kDa persisting after hydrolysis. This suggests that earthworms inherently contain a significant proportion of low molecular weight proteins, which may be more readily extracted with certain solvents such as 80% ethanol.

The experiment evaluating the antifungal activity against *C. albicans* revealed varying inhibition zone diameters and MIC for earthworm extracts obtained using different solvents, ranging from 5.3 to 13.3 mm and 75 to 250 mg/mL, respectively (see Table 2). While the antifungal activities of extracts from various earthworm species have been reported [9–13], information on the antifungal activity of extracts from *P. excavatus* in Vietnam remains limited, potentially making this report the first of its kind. Notably, the 80% ethanol extract exhibited the strongest antifungal activity against *C. albicans*, with an inhibition zone diameter of 13.3 mm and an MIC of 75 mg/mL. This potency could be attributed to several factors, including the composition of the extract and its underlying mechanism of action. The observation that the 80% ethanol extract predominantly contains low molecular weight proteins (<30 kDa) suggests a possible correlation between protein content and antifungal activity. These low molecular weight proteins may possess specific bioactive peptides or compounds with potent antifungal properties, enhancing the extract's efficacy against *C. albicans* [46]. Additionally, the mechanism of action of earthworm extracts against *C. albicans* may involve multiple pathways. One potential mechanism is the disruption of fungal cell membranes by bioactive

compounds present in the extract [47]. This disruption can lead to leakage of intracellular contents, loss of membrane integrity, and ultimately, fungal cell death. Certain bioactive peptides or proteins within the extract may interfere with essential fungal processes such as cell wall synthesis, protein synthesis, or DNA replication, thereby inhibiting fungal growth and proliferation [48]. In addition, the presence of secondary metabolites, such as phenolic compounds or alkaloids, in the earthworm extract could contribute to its antifungal activity by exerting oxidative stress on fungal cells or interfering with key cellular pathways [47]. In conclusion, the strong antifungal activity of the 80% ethanol extract against *C. albicans* underscores the potential therapeutic value of earthworm extracts as natural antifungal agents.

The DPPH and ABTS assays were employed to assess the antioxidant activity of earthworm extracts. Results revealed IC_{50} values ranging from 231.3 to 838.7 $\mu\text{g/mL}$ for the DPPH assay and 208.9 to 864.5 $\mu\text{g/mL}$ for the ABTS assay, indicating varied antioxidant potency across extracts obtained using different solvents (see Fig. 5). The antioxidant activity from extracts of other earthworms has been reported [19–21]. However, limited information exists regarding the antioxidant activity of extracts from *P. excavatus*, a species of earthworm found in Vietnam, making this study potentially the first to report on this aspect. Notably, the 80% ethanol extract exhibited the highest antioxidant activity in both the DPPH and ABTS assays, with IC_{50} values of 231.3 and 208.9 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The superior antioxidant activity of the 80% ethanol extract in both DPPH and ABTS assays can be attributed to several factors, primarily the presence of low molecular weight proteins (<30 kDa) within the extract. Low molecular weight proteins are known to possess potent antioxidant properties due to their ability to donate hydrogen atoms or electrons to neutralize free radicals [49–51]. This donation process interrupts the free radical chain

reaction, thus mitigating oxidative stress. Additionally, 80% ethanol as a solvent might efficiently extract these low molecular weight proteins along with other bioactive compounds, enhancing the overall antioxidant activity of the extract [37]. This finding highlights the potential therapeutic benefits of earthworm extracts, especially those obtained using 80% ethanol, in combating oxidative stress-related disorders.

CONCLUSIONS

In conclusion, the study demonstrated that the choice of solvent significantly impacts the extraction efficiency and composition of proteinaceous materials from earthworm powder. Aqueous extraction proved to be the most effective method, yielding the highest extraction efficiency and protein content. This was supported by TLC results showing the presence of amino acids and peptides in the extracts. Additionally, FTIR spectroscopy confirmed the presence of characteristic peaks associated with protein structures in all extracts. SDS-PAGE analysis revealed distinct patterns in protein composition, with proteins primarily below 50 kDa and especially proteins below 30 kDa when 80% ethanol extraction was used. Furthermore, the antifungal activity against *C. albicans* varied among extracts, with the 80% ethanol extract exhibiting the highest efficacy. In addition, earthworm powder extracts showed antioxidant activity, with the 80% ethanol extract demonstrating the highest scavenging activity against DPPH and ABTS radicals. These findings underscore the potential of earthworm powder extracts as sources of bioactive compounds with diverse applications in pharmaceutical and cosmetic industries. Further research exploring the bioactive components responsible for these activities and their mechanisms of action is warranted to fully harness the therapeutic potential of earthworm-derived products.

REFERENCES

1. Loc P.K., Yen M.D., Averyanov L. Biodiversity in Vietnam. In: Pullaiah T. (ed.). *Global biodiversity*. Apple Academic Press; 2018, p. 473-502. DOI: 10.1201/9780429487743-14.
2. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27(1):1-93. DOI: 10.1016/j.mam.2005.07.008.
3. Angiolella L., Sacchetti G., Efferth T. Antimicrobial and antioxidant activities of natural compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018;2018:1945179. DOI: 10.1155/2018/1945179.
4. Atanasov A.G., Zotchev S.B., Dirsch V.M., Supuran C.T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20:200-216. DOI: 10.1038/s41573-020-00114-z.
5. Afreen S., Shaikh A. Therapeutic uses of earthworm – a review. *International Journal of Advanced Ayurveda, Yoga, Unani, Siddha and Homeopathy*. 2020;9:571-580. DOI: 10.23953/cloud.ijaayush.469.
6. Grdisa M. Therapeutic properties of earthworms. *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*. 2013;7(1):1-5.
7. Ding S., Lin X., He S. Earthworms: a source of protein. *Journal of Food Science and Engineering*. 2019;9:159-170. DOI: 10.17265/2159-5828/2019.05.001.
8. Li W., Wang C., Sun Z. Vermipharmaceuticals and active proteins isolated from earthworms. *Pedobiologia*. 2011;54:S49-S56. DOI: 10.1016/j.pedobi.2011.09.014.
9. Mathur A., Verma S.K., Bhat R., Singh S.K., Prakash A., Prasad G.B.K.S., et al. Antimicrobial activity of earthworm extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2010;2(4):364-370.
10. Vasanthi K., Chairman K., Ranjit Singh A.J.A. Antimicrobial activity of earthworm (*Eudrilus eugeniae*) paste. *African Journal of Environmental Science and Technology*. 2013;7(8):789-793. DOI: 10.5897/AJEST2013.1455.
11. Chauhan P.S., Tomar J., Prasad G.B.K.S., Agrawal O.P. Evaluation of antimicrobial activity of earthworm *Eudrilus eugeniae* tissue extract. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2014;6(8):28-38.
12. Bhorgin A.J., Uma K. Antimicrobial activity of earthworm powder (*Lampito mauritii*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2014;3(1):437-443.
13. Singh S.I., Khanna N., Wangkheimayum J., Bhattacharjee A. Earthworm as a potential antimicrobial source. In: Vig A.P., Singh J., Suthar S. (eds). *Earthworm engineering and applications*. New York: Nova Science Publishers Inc; 2022, p. 229-244.

14. Deng Z., Yin J., Luo W., Kotian R.N., Gao S., Yi Z., et al. The effect of earthworm extract on promoting skin wound healing. *Bioscience Reports*. 2018;38(2):BSR20171366. DOI: 10.1042/BSR20171366.
15. Wang D., Ruan Z., Zhang R., Wang X., Wang R., Tang Z. Effect of earthworm on wound healing: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:691742. DOI: 10.3389/fphar.2021.691742.
16. Balamurugan M., Parthasarathi K., Cooper E.L., Ranganathan L.S. Anti-inflammatory and anti-pyretic activities of earthworm extract – *Lampito mauritii* (Kinberg). *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;121:330-332. DOI: 10.1016/j.jep.2008.10.021.
17. Mathur A., Verma S.K., Singh S.K., Prakash A., Prasad G.B.K.S., Dua V.K. Anti-inflammatory activity of earthworm extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2011;2(2):278-281.
18. Madhusudan D., Ranjib G., Deepjyoti B., Surajit B., Kumar S.S. Anti-inflammatory effect of extract of earthworm *Eutyphoeus Gammiei* from Tripura, north eastern India. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2018;8:622-627.
19. Balamurugan M., Parthasarathi K., Ranganathan L.S., Cooper E.L. Hypothetical mode of action of earthworm extract with hepatoprotective and antioxidant properties. *Journal of Zhejiang University – Science B*. 2008;9:141-147. DOI: 10.1631/jzus.B0720194.
20. Aldarraji Q.M., Halimoon N., Majid N.M. Antioxidant activity and total phenolic content of earthworm paste of *Lumbricus rubellus* (red worm) and *Eudrilus eugenia* (African night crawler). *Journal of Entomology and Nematology*. 2013;5:33-37. DOI: 10.5897/JEN2013.0075.
21. Mustafa R.G., Saiqa A., Domínguez J., Jamil M., Manzoor S., Wazir S., et al. Therapeutic values of earthworm species extract from Azad Kashmir as anticoagulant, antibacterial, and antioxidant agents. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2022;2022:6949117. DOI: 10.1155/2022/6949117.
22. Augustine D., Rao R.S., Anbu J., Murthy K.N. Anticancer prospects of earthworm extracts: a systematic review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Pharmacognosy Reviews*. 2018;12(23):46-55. DOI: 10.4103/phrev.phrev_45_17.
23. Shafi F.A.A., Faleh N. Anticancer activity of earthworm powder (*Lumbricus terrestris*) against MCF-7 and PC-3 cancer cell lines. *Journal of Gastrointestinal Cancer*. 2019;50:919-925. DOI: 10.1007/s12029-019-00268-z.
24. Augustine D., Rao R.S., Anbu J., Chidambaram Murthy K.N. *In vitro* antiproliferative effect of earthworm coelomic fluid of *Eudrilus eugeniae*, *Eisenia foetida*, and *Perionyx excavatus* on squamous cell carcinoma-9 cell line: a pilot study. *Pharmacognosy Research*. 2017;9:S61-S66. DOI: 10.4103/pr.pr_52_17.
25. Deng Z., Gao S., Xiao X., Yin N., Ma S., Li W., et al. The effect of earthworm extract on mice S180 tumor growth and apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;115:108979. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108979.
26. Phan T.T.B., Ta T.D., Nguyen D.T.X., Van Den Broek L.A.M., Duong G.T.H. Purification and characterization of novel fibrinolytic proteases as potential antithrombotic agents from earthworm *Perionyx excavatus*. *AMB Express*. 2011;1:26. DOI: 10.1186/2191-0855-1-26.
27. Bui P.T., Pham K.T., Vo T.D.L. Earthworm (*Perionyx excavatus*) protein hydrolysate: hypoglycemic activity and its stability for the hydrolysate and its peptide fractions. *Processes*. 2023;11(8):2490. DOI: 10.3390/pr11082490.
28. Azmi N., Hashim P., Hashim D.M., Halimoon N., Majid N.M.N. Anti-elastase, anti-tyrosinase and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti-aging agent. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014;4:S348-S352. DOI: 10.12980/APJTB.4.2014C1166.
29. Goyal K., Singh N., Jindal S., Kaur R., Goyal A., Awasthi R. Kjeldahl method. In: Goyal A., Kumar H. (eds). *Advanced techniques of analytical chemistry*. Bentham Science Publishers; 2022, p. 105-112. DOI: 10.2174/9789815050233122010011.
30. Ramya M.S., Sivasubramanian K., Ravichandran S., Anbuechzhian R. Screening of antimicrobial compound from the sea slug *Armina babai*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2014;9(3):268-274. DOI: 10.3329/bjp.v9i3.18483.
31. Hua Z., Wang Y.H., Cao H.-W., Pu L.-J., Cui Y.-D. Purification of a protein from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* and evaluation of its hemolytic, antibacterial, and antitumor activities. *Pharmaceutical Biology*. 2011;49(3):269-275. DOI: 10.3109/13880209.2010.508498.
32. Thin D.B., Korneeva A.A., Tinh B.B., Ogunwande I.A. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and methanol extract from the stems of *Dasymaschalon rostratum* Merr. & Chun. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2023;49:815-822. DOI: 10.1134/S1068162023040209.
33. Tinh B.B., Khoi N.T., Doudkin R.V., Thin D.B., Ogunwande I.A. Chemical composition of essential oil and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Knema globularia* (Lam.) Warb. from Vietnam. *Natural Product Research*. 2023;37(10):1625-1631. DOI: 10.1080/14786419.2022.2103698.
34. Tinh B.B., Thin D.B., Ogunwande I.A. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of essential oil from the leaves of *Vernonia volkameriifolia* DC. *Natural Product Communications*. 2024;19(3):1-8. DOI: 10.1177/1934578X241239477.
35. Banwo K., Olojede A.O., Adesulu-Dahunsi A.T., Verma D.K., Thakur M., Tripathy S., et al. Functional importance of bioactive compounds of foods with potential health benefits: a review on recent trends. *Food Bioscience*. 2021;43:101320. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101320.
36. Abubakar A.R., Haque M. Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2020;12(1):1-10. DOI: 10.4103/jpbs.JPBS_175_19.
37. Plaskova A., Mlcek J. New insights of the application of water or ethanol-water plant extract rich in active compounds in food. *Frontiers in Nutrition*. 2023;10:1118761. DOI: 10.3389/fnut.2023.1118761.
38. Perva-Uzunalić A., Škerget M., Knez Ž., Weinreich B., Otto F., Grüner S. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*. 2006;96(4):597-605. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.03.015.
39. Drużyńska B., Stępniewska A., Wołosiak R. The influence of time and type of solvent on efficiency of the

extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 2007;6(1):27-36.

40. Byers M., Miflin B.J., Smith S.J. A quantitative comparison of the extraction of protein fractions from wheat grain by different solvents, and of the polypeptide and amino acid composition of the alcohol-soluble proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1983;34(5):447-462. DOI: 10.1002/jsfa.2740340506.

41. Yan J.-K., Ding Z.-C., Gao X., Wang Y.-Y., Yang Y., Wu D., et al. Comparative study of physicochemical properties and bioactivity of *Hericium erinaceus* polysaccharides at different solvent extractions. *Carbohydrate Polymers*. 2018;193:373-382. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.04.019.

42. Haworth C., Oliver R.W.A. A study of the relationship between the chromatographic mobilities of peptides and their constituent amino acids on paper and thin layers of cellulose. *Journal of Chromatography A*. 1972;64(2):305-316. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)85408-4.

43. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) –Bioenergetics*. 2007;1767:1073-1101. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004.

44. Stevenson C.L. Characterization of protein and peptide stability and solubility in non-aqueous solvents. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2000;1(2):165-182. DOI: 10.2174/1389201003378942.

45. Tram P.T.B., Tram P.T.Q., Toan H.T., Hong P.T.A. Study on the factors influencing the yield of amination in the decomposition process of the earthworm *Perionyx excavatus*. *Journal of Agriculture and Rural Development*. 2008;4:53-56.

46. Al Saiqali M., Tangutur A.D., Banoth C., Bhukya B. Antimicrobial and anticancer potential of low molecular weight polypeptides extracted and characterized from leaves of *Azadirachta indica*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;114:906-921. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.169.

47. Anitha J., Jairaaj I.A. In-vitro antibacterial activity and evaluation of flavonoid and phenol in earthworm powder (*Eudrilus eugeniae*). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013;2(6):4917-4928.

48. Wu Y., Deng S., Wang X., Thunders M., Qiu J., Li Y. Discovery and mechanism of action of a novel antimicrobial peptide from an earthworm. *Microbiology Spectrum*. 2023;11(1):03206-03222. DOI: 10.1128/spectrum.03206-22.

49. Malaypally S.P., Liceaga A.M., Kim K.-H., Ferruzzi M., San Martin F., Goforth R.R. Influence of molecular weight on intracellular antioxidant activity of invasive silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 2015;18:1158-1166. DOI: 10.1016/j.jff.2014.06.011.

50. Li X., Han L., Chen L. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008;88(9):1660-1666. DOI: 10.1002/jsfa.3264.

51. Ranathunga S., Rajapakse N., Kim S.-K. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). *European Food Research and Technology*. 2006;222:310-315. DOI: 10.1007/s00217-005-0079-x.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nguyen T. Dung,

Researcher,
Biotechnology Center of Ho Chi Minh City,
2374, National Highway 1,
Ho Chi Minh City, 70000, Vietnam,
thuydung9810@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-1022-3748>

Pham H. Son,

Researcher,
Biotechnology Center of Ho Chi Minh City,
2374, National Highway 1,
Ho Chi Minh City, 70000, Vietnam,
haison010695@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0009-9350-9765>

Nguyen T.N. Trinh,

Researcher,
Biotechnology Center of Ho Chi Minh City,
2374, National Highway 1,
Ho Chi Minh City, 70000, Vietnam,
nutrinh28218@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-1767-7435>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Дунг Нгуен Тхи,

научный сотрудник,
Биотехнологический центр города Хошимина,
70000, г. Хошимин, Национальное
шоссе 1, 2374, Вьетнам,
thuydung9810@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-1022-3748>

Сон Фам Хай,

научный сотрудник,
Биотехнологический центр города Хошимина,
70000, г. Хошимин, Национальное
шоссе 1, 2374, Вьетнам,
haison010695@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0009-9350-9765>

Тринь Нгуен Тхи Ну,

научный сотрудник,
Биотехнологический центр города Хошимина,
70000, г. Хошимин, район 12, Национальное шоссе
1, 2374, Вьетнам,
nutrinh28218@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-1767-7435>

Vo N.T. Thao,
Researcher,
Biotechnology Center of Ho Chi Minh City,
2374, National Highway 1,
Ho Chi Minh City, 70000, Vietnam,
vothao2297@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0001-7348-6502>

Bui L.K. Tu,
Researcher,
Biotechnology Center of Ho Chi Minh City,
2374, National Highway 1,
Ho Chi Minh City, 70000, Vietnam,
khatu09021990@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0004-3359-1326>

Le Q. Luan,
Associate Professor, Researcher,
Biotechnology Center of Ho Chi Minh City,
2374, National Highway 1,
Ho Chi Minh City, 70000, Vietnam,
lequangluan@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-2154-343X>

Bui B. Thinh,
Researcher,
Biotechnology Center of Ho Chi Minh City,
2374, National Highway 1,
Ho Chi Minh City, 70000, Vietnam,
✉ buibaothinh9595@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3826-1199>

Le V. Hai,
Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
Biotechnology Center of Ho Chi Minh City,
2374, National Highway 1,
Ho Chi Minh City, 70000, Vietnam,
Phan Chau Trinh University,
9, Nguyen Gia Thieu St., Quang Nam, 51000,
Vietnam,
✉ hailevan.chem@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0006-9465-3281>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

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

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

Information about the article

Поступила в редакцию 20.08.2024.
Одобрена после рецензирования 07.11.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

Тхао Во Нгуен Тхань,
научный сотрудник,
Биотехнологический центр города Хошимина,
70000, г. Хошимин, Национальное
шоссе 1, 2374, Вьетнам,
vothao2297@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0001-7348-6502>

Ту Буй Ле Кха,
научный сотрудник,
Биотехнологический центр города Хошимина,
70000, г. Хошимин, Национальное
шоссе 1, 2374, Вьетнам,
khatu09021990@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0004-3359-1326>

Луан Ле Куанг,
доцент, научный сотрудник,
Биотехнологический центр города Хошимина,
70000, г. Хошимин, Национальное
шоссе 1, 2374, Вьетнам,
lequangluan@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-2154-343X>

Тхинь Буй Бао,
научный сотрудник,
Биотехнологический центр города Хошимина,
70000, г. Хошимин, Национальное
шоссе 1, 2374, Вьетнам,
✉ buibaothinh9595@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3826-1199>

Хай Ле Ван,
к.х.н., научный сотрудник,
Биотехнологический центр города Хошимина,
70000, г. Хошимин, Национальное
шоссе 1, 2374, Вьетнам,
Университет Фан Чау Тринь,
51000, г. Куанг Нам, ул. Нгуен Зиа Тьеу, 9,
Вьетнам,
✉ hailevan.chem@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0006-9465-3281>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 20.08.2024.
Одобрена после рецензирования 07.11.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

Научная статья
УДК 661.124:615.33
EDN: YSVNQA
DOI: 10.21285/achb.952



Полимерные конъюгаты цефотаксима и кинетика его высвобождения

Т.Г. Тюрина, Т.В. Крюк, Н.О. Шевчук✉

Институт физико-органической химии и углехимии им. Л.М. Литвиненко,
Донецк, Донецкая Народная Республика, Российская Федерация

Аннотация. Целью проведенного исследования являлось изучение продуктов взаимодействия в растворе антибиотика цефотаксима с янтарным ангидридом, сополимером малеинового ангидрида и диальдегидной формой пшеничного крахмала. Показано, что в результате реакции цефотаксима с янтарным ангидридом образуется сукцинамид; для сополимера малеинового ангидрида вероятно связывание цефотаксима по типу нековалентного межмолекулярного взаимодействия. Обнаружено образование азометинового производного окисленного полисахарида с цефотаксимом, мольное соотношение исходных глюкозидных звеньев крахмала, диальдегидных непрореагировавших и связанных с цефотаксимом азометиновой связью составляет 0,204:0,606:0,19. Изучено высвобождение лекарственного вещества из полученной матричной формы в различных биорелевантных средах (физраствор, фосфатный буфер, буфер Трис-HCl). Установлено, что количество высвободившегося цефотаксима приближается к 100% за 10 ч, процесс его высвобождения протекает по двум фазам. В течение первой фазы (1–2 ч) в раствор выходит от 70 (pH 7,4–8,0) до 35% (pH 7,14) лекарственного вещества, после чего скорость процесса существенно снижается. Обработка кинетических данных по уравнениям первого порядка и Хигучи показала соответствие обоим моделям. Найденные константы скорости возрастают пропорционально величине pH раствора. Предполагается, что первоначально протекает гидролиз азометиновой связи с отщеплением молекул цефотаксима от полимерной матрицы, затем растворение находящихся на поверхности макромолекул окисленного крахмала, вследствие повышения вязкости слоя раствора, окружающего частицу конъюгата, скорость гидролиза снижается. В целом высвобождение цефотаксима из конъюгата протекает как реакция псевдопервого порядка, сопровождающаяся вкладом диффузионных процессов.

Ключевые слова: конъюгат, цефотаксим, янтарный ангидрид, сополимер малеинового ангидрида, окисленный крахмал, высвобождение

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Министерства образования и науки Российской Федерации, проект FRES-2023-0002.

Для цитирования: Тюрина Т.Г., Крюк Т.В., Шевчук Н.О. Полимерные конъюгаты цефотаксима и кинетика его высвобождения // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 472–481. DOI: 10.21285/achb.952. EDN: YSVNQA.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Polymeric conjugates of cefotaxime and its release kinetics

Tatyana G. Tyurina, Tatyana V. Kryuk, Natalia O. Shevchuk✉

L.M. Litvinenko Institute of Physical Organic and Coal Chemistry,
Donetsk, Donetsk People's Republic, Russian Federation

Abstract. The present study examines reaction products in the solution of antibiotic cefotaxime with succinic anhydride, maleic anhydride copolymer, and dialdehyde wheat starch. The reaction of cefotaxime with succinic anhydride is shown

© Тюрина Т.Г., Крюк Т.В., Шевчук Н.О., 2024

to produce succinamide; to maleic anhydride copolymer, cefotaxime is likely to bind via noncovalent intermolecular interactions. An azomethine derivative of oxidized polysaccharide with cefotaxime was found to form; the molar ratio of initial glucosidic units in starch, unreacted dialdehyde units, and those bonded to cefotaxime through the azomethine linkage is 0.204:0.606:0.19. Drug release from the obtained matrix form was studied in different biorelevant media (saline, phosphate buffer, and Tris-HCl buffer). The amount of cefotaxime released in ten hours was found to approach 100%. Its release proceeds in two phases. In the first phase (1–2 h), 35 (pH 7.14) to 70% (pH 7.4–8.0) of the drug substance is released into the solution, followed by a significant decrease in the release rate. The processing of kinetic data using the first-order and Higuchi equations revealed consistency with both models. The obtained rate constants increase in proportion to the solution pH. It is assumed that first, the azomethine bond hydrolysis occurs with the release of cefotaxime molecules from the polymer matrix; then, the macromolecules of oxidized starch residing on the surface are dissolved; due to an increase in the viscosity of the solution layer surrounding the conjugate particle, the hydrolysis rate decreases. In general, cefotaxime release from the conjugate proceeds as a pseudo-first-order reaction accompanied by diffusion processes.

Keywords: conjugate, cefotaxime, succinic anhydride, maleic anhydride copolymer, oxidized starch, release

Funding. Ministry of Education and Science of the Russian Federation supported the work (State task FRES-2023-0002).

For citation: Tyurina T.G., Kryuk T.V., Shevchuk N.O. Polymeric conjugates of cefotaxime and its release kinetics. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):472–481. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.952. EDN: YSVNQA.

ВВЕДЕНИЕ

Конъюгаты полимер – лекарство считаются эффективными фармацевтическими средствами благодаря возможности адресной доставки, контролируемого высвобождения и снижения токсичности лекарственных препаратов. Данный вид полимерной терапии активно развивается последние 40 лет, в результате чего на рынке появился ряд конъюгатов полимер – фармацевтический агент и полимер – белок; также большое количество подобных систем проходит клинические испытания в настоящее время [1].

Тем не менее существует еще много проблем, которые открывают возможности для дальнейшего развития исследований, направленных на разработку новых полимерных конъюгатов. В частности, проблемой является повышение неэффективности существующего арсенала антибиотиков в результате эволюции патогенов с лекарственной устойчивостью из-за массового употребления антимикробных препаратов [2]. Поскольку открытие новых классов антибиотиков с инновационным механизмом действия – процесс весьма длительный и дорогостоящий, одной из стратегий решения обозначенной проблемы может быть применение известных веществ, обладающих антибактериальной активностью, связанных с полимерным носителем. Полимеры с собственными антимикробными свойствами или способные конъюгироваться с уже существующими антибиотиками создают возможность как для их непосредственного применения в качестве лекарств, так и для имплантации в медицинские устройства для борьбы с инфекцией [3].

В качестве полимерной основы конъюгатов возможно использование высокомолекулярных соединений различной природы при условии, что они отвечают ряду требований, основные из которых – биосовместимость, биоразлагаемость и минимальная токсичность [4]. Среди синтетических полимеров, способных к биоразложению и обладающих иммуногенностью, в системах доставки лекарств рекомендуют использовать α -гидроксикислоты, полиангидриды,

поли(амиды), поли(эфирамиды), поли(алкилцианоакрилаты) и др. [5]. Полимеры, полученные из возобновляемых ресурсов, в частности полисахариды, также обладают огромным потенциалом для создания систем доставки благодаря своей гидрофильности, высокой стабильности, безопасности, отсутствию токсичности и биоразлагаемости [6].

Целью настоящей работы было получение полимерных конъюгатов, проявляющих антимикробное действие, в которых антибактериальным агентом является цефотаксим, полимером – сополимер малеинового ангидрида с винилацетатом или окисленный крахмал. Выбор в качестве антибиотика цефотаксима обусловлен тем, что он обладает широким спектром бактерицидной активности и высокой эффективностью – от 75 до 100% при назначении госпитализированным пациентам с инфекциями средней и тяжелой степени¹. Соплимеры малеинового ангидрида являются физиологически активными, биосовместимыми, хорошо растворимыми в воде, обладают низкой цитотоксичностью и собственной антимикробной активностью; наличие ангидридной группы позволяет вводить в состав сополимера лекарственные вещества, имеющие amino- и гидроксильные группы [7, 8]. Конъюгацию лекарственных субстанций с полисахаридами чаще всего проводят после функционализации их макромолекул, разновидностью которой является окисление диольных групп глюкозных структур [9, 10]. Дегидрированный крахмал, получаемый периодатным окислением полисахарида, проявляет антиоксидантную и антимикробную активность [11], поэтому именно данный вид модифицированного крахмала был выбран нами для получения конъюгата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческие продукты: цефотаксим в виде натриевой соли («Биохимик», Россия), пшеничный, картофельный крахмал («Плещеевский крахмальный завод», Россия), янтарный ангидрид (Hangzhou Keying Chem Co., Китай). Соплимер синтезировали по

¹ Padda I.S, Nagalli S. Cefotaxime // Ncbi.nlm.nih.gov. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560653/> (дата обращения: 21.05.2024).

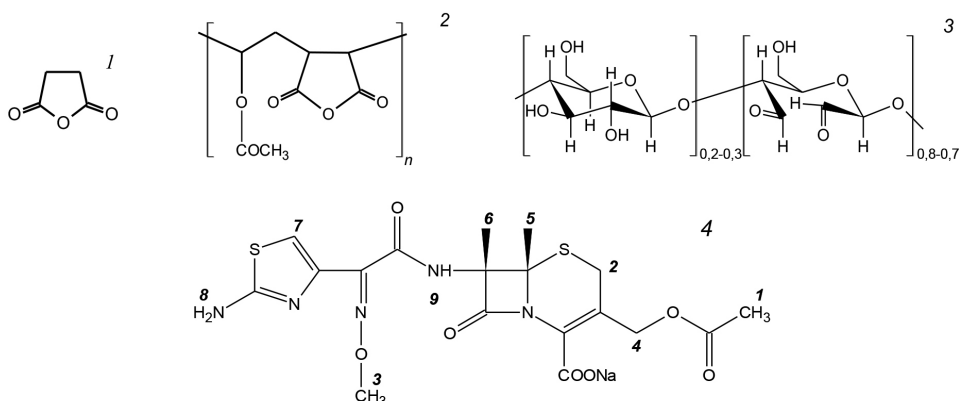


Рис. 1. Янтарный ангидрид (1), сополимер (2), окисленный крахмал (3), цефотаксим (4)

Fig. 1. Succinic anhydride (1), copolymer of maleic anhydride with vinyl acetate (2), oxidized starch (3), and cefotaxime (4)

схеме, описанной в работе [12]. Структуры исходных веществ представлены на рис. 1.

Во всех синтезах соотношение звена полимера и цефотаксима составляло 1:1 моль/моль.

Получение конъюгата сополимер – цефотаксим. Предварительно цефотаксим в форме натриевой соли переводили в H^+ -форму, как описано в работе [13]. Реакцию между сополимером (0,1850 г) и цефотаксимом (0,4575 г) проводили при температуре $50 \pm 0,5$ °C в течение 2 ч в растворе 1,4-диоксана (4 мл). В качестве осадителя использовали CH_2Cl_2 , выделенный продукт сушили в вакуумном сушильном шкафу при 40 ± 1 °C до постоянной массы. Аналогично проводили реакцию между 0,4595 г цефотаксима и 0,1000 г янтарного ангидрида.

Получение конъюгата окисленный крахмал – цефотаксим. Крахмал окисляли и анализировали, как описано в работе [14]. Образование альдегидного производного подтверждено появлением в инфракрасных (ИК) спектрах характеристической полосы валентных колебаний карбонильной группы $-CHO$ (1730 см^{-1}), которая отсутствует в спектре исходного крахмала. Степень окисления в продуктах реакции составляла от 69 до 80 масс.%, выход окисленного крахмала – от 71 до 88 масс.% ($N = 6$). К суспензии 0,1610 г окисленного крахмала в 1,5 мл бидистиллята приливали раствор цефотаксима натрия (0,4775 г в 1,5 мл бидистиллята), добавляли 2 мл янтарно-кислотно-боратного буферного раствора (pH 5,2) и выдерживали при температуре $50 \pm 0,5$ °C в течение 2 ч. Полученную желеобразную массу высаждали в ацетон и высушивали при 50–60 °C.

При комнатной температуре в области 4000–600 см^{-1} с помощью Фурье-спектрометра Tensor 27 (Bruker, Германия) регистрировали ИК-спектры порошкообразных образцов окисленного крахмала, с помощью спектрофотометра Specord 75IR (Carl Zeiss,

Германия) – в таблетках в KBr. Ультрафиолетовые (УФ) спектры растворов в биореlevantных средах регистрировали на спектрофотометре Helios Gamma (Thermo Electron Corporation, США) в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см, спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) 1H – на спектрометре Bruker Avance II (Bruker, Германия, 400 МГц) в среде $DMSO-d_6$ и D_2O .

Отнесение сигналов протонов в спектре цефотаксима проводили, сопоставляя положение, соотношение интегральных интенсивностей сигналов и результатов теоретического моделирования с применением пакета программ ACDLABS².

Высвобождение цефотаксима из матричной формы исследовали по методике, описанной в работе [14], в физрастворе (pH 7,14), фосфатном буфере (pH 7,4) и буфере Трис-НСl (pH 8,02); буферные растворы готовили по схемам, описанным в Государственной фармакопее Российской Федерации³ и Справочнике биохимика Р. Досона и др.⁴.

Обработку данных процесса высвобождения проводили с использованием кинетических моделей первого порядка (1) и Хигучи (2) [15]:

$$\ln \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right) = -k_1 \times t, \quad (1)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \times \sqrt{t}, \quad (2)$$

где t – время высвобождения, ч; M_t/M_∞ – доля цефотаксима, высвободившаяся в момент времени t ; k – кинетическая константа.

Статистический анализ результатов высвобождения проводился с помощью программы Statgraphics Centurion 18⁵. Использовался однофакторный дисперсионный анализ (One-Way ANOVA), уровень значимости 95%, количество параллельных экспериментов 3.

² Bhal S. Multi-technique, vendor-neutral analytical data handling for chemists // Acdlabs.com. Режим доступа: https://www.acdlabs.com/wp-content/uploads/download/app/spectrum/appnote_spectrumproc_multitechnique.pdf (дата обращения: 12.04.2024).

³ Государственная фармакопея Российской Федерации. М.: Минздрав России, 2018. 1807 с.

⁴ Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика / пер. с англ. М.: Мир, 1991. 543 с.

⁵ Statgraphics Centurion 18 // Statgraphics.com. Режим доступа: <https://www.statgraphics.com/centurion-xviii> (дата обращения: 12.04.2024).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Структура и состав конъюгатов были изучены с применением метода ^1H ЯМР-спектроскопии, результаты отнесения сигналов протонов исходного цефотаксима и его фрагментов в составе полученных продуктов представлены в табл. 1.

Таблица 1. Химические сдвиги (δ) протонов цефотаксима и его фрагмента в продуктах модификации янтарного ангидрида и сополимера малеинового ангидрида с винилацетатом (DMSO- d_6)

Table 1. Chemical shifts (δ) of protons of cefotaxime and its fragment in products of modification of succinic anhydride and poly(maleic anhydride-co-vinyl acetate) (DMSO- d_6)

Номер Н (рис. 1)	δ , м.д.		Диапазон δ , м.д.
	цефотаксим	янтарный ангидрид – цефотаксим	
1, 3Н	2,02 с	2,03 с	2,03
2, 2Н	3,55 д	перекрывание с сигналом воды (3,2–3,8 м.д.)	
3, 3Н	3,83 с	3,88 с	3,83 с; 3,81–3,94
4, 2Н	4,69 д 4,96 д	4,81 д 4,99 д	4,68 д; 4,62–4,65; 4,98 д; 5,02–5,05
5, 1Н	5,15 д	5,16 д	5,14 д; 5,15–5,21
6, 1Н	5,78 дд	5,83 дд	5,78 дд; 5,81–5,86
7, 1Н	6,74 с	7,35 с	6,74 с; –
8, 2Н	7,24 с	–	7,23 уш.с; 7,29–7,38
9, 1Н	9,62 д	9,71 д	9,62 д; 9,67–9,76

Для анализа предполагаемого полимерного конъюгата сополимер – цефотаксим предварительно рассмотрели спектры продукта взаимодействия цефотаксима с низкомолекулярной моделью звена малеинового ангидрида – янтарным ангидридом.

На образование нового соединения – амида цефотаксима – указывает изменение вида ИК-спектра продукта по сравнению с исходными реагентами (рис. 2). Отнесение полос в спектре цефотаксима осложняется наличием большого количества функциональных групп, поглощающих в одних и тех же областях (первичная, вторичная аминогруппы, амидная, сложноэфирная группа, СН в ароматических структурах). Тем не менее отчетливо видны изменения в области валентных колебаний $\text{C}=\text{O}$: в спектре продукта янтарного ангидрида с цефотаксимом отсутствуют характеристические для ангидрида полосы при 1865 и 1790 cm^{-1} , но появляются полосы при 1779, 1726 cm^{-1} , соответствующие включению в состав продукта группы CH_2-COOH (в свободной и Н-связанной форме), перекрывающие присутствующие в спектре цефотаксима полосы при 1745, 1711 cm^{-1} (сложноэфирная группа). Полоса $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ амида ($\text{NH}-\text{C}=\text{O}$) при 1530 cm^{-1} , уже имеющаяся в спектре цефотаксима, существенно уширяется в спектре продукта янтарный ангидрид – цефотаксим.

В области колебаний $\nu_{\text{C}-\text{H}}$ вид спектра также изменяется: вместо полос при 3460 и 3310 cm^{-1} (ν_{NH_2} и NH) и серии полос в области 3110–3000 cm^{-1} для цефотаксима видим одну широкую интенсивную полосу в области 3660–3050 cm^{-1} , скорее всего, за счет наличия взаимо-

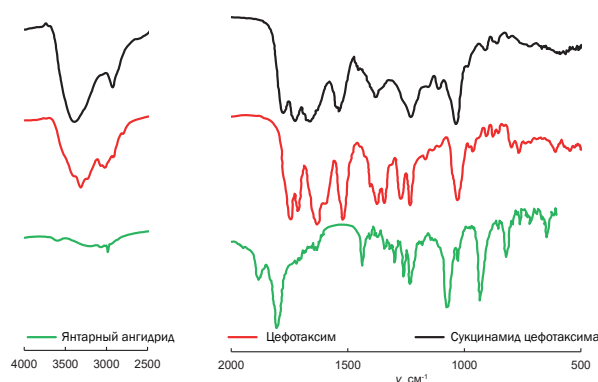


Рис. 2. ИК-спектры янтарного ангидрида, цефотаксима, сукцинамида цефотаксима (в таблетках KBr)

Fig. 2. IR spectra of succinic anhydride, cefotaxime, succinamide of cefotaxime (in KBr tablets)

действия по типу Н-связей между группами COOH двух молекул или COOH и полярными группами фрагмента цефотаксима в составе молекулы сукцинамида.

С большей достоверностью образование сукцинамида цефотаксима доказывают результаты ЯМР-спектроскопии. В ЯМР-спектре выделенного продукта проявляется три набора сигналов: цефотаксима, вошедшего в состав сукцинамида (см. табл. 1), непрореагировавших янтарного ангидрида и цефотаксима.

Образование амида подтверждается в первую очередь отсутствием в спектре продукта взаимодействия цефотаксима с янтарным ангидридом резонанса протонов аминогруппы цефотаксима (8) и смещением сигнала 7 протонов группы СН тиазольного кольца цефотаксима в область слабого поля – с 6,74 до 7,35 м.д. (рис. 3) при постоянстве положения всех остальных сигналов (1–6, 9) свободного цефотаксима. Кроме того, в спектре появляется уширенный синглет с центром при 12,53 м.д. (см. рис. 3), наличие которого обусловлено наложением резонансов протонов групп COOH во фрагменте янтарной кислоты и NH вторичной аминогруппы сукцинамида, а также мультиплет при 2,55–2,65 м.д., относящийся к протонам группы $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ фрагмента янтарной кислоты. В целом данные ^1H ЯМР-спектроскопии позволяют говорить о ковалентном связывании янтарного ангидрида и цефотаксима; количество образовавшегося амида составило ~ 55 масс. %.

Для продукта взаимодействия янтарного ангидрида с цефотаксимом характерно существенное изменение вида УФ-спектра в области 250–320 нм по сравнению со спектром лекарственного вещества (рис. 4), что дополнительно подтверждает образование сукцинамида.

В ^1H ЯМР-спектре продукта модификации сополимера антибиотиком также проявляются три разновидности сигналов. В первой группе они полностью совпадают по мультиплетности и положению, а также по соотношению интенсивностей с сигналами 1–9 протонов исходного цефотаксима; во второй группе – с сигналами протонов сополимера. В третью группу входят малоинтенсивные уширенные сигналы, находящиеся рядом с сигналами исходного цефотаксима (рис. 3). Можно полагать, что они относятся к протонам молекул цефотаксима, нековалентно связанного с сополимером (см. табл. 1).

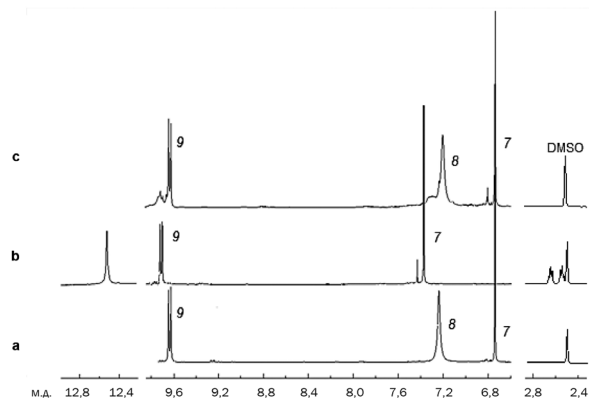


Рис. 3. Фрагменты ^1H ЯМР-спектра цефотаксима (а) и продуктов его взаимодействия с янтарным ангидридом (б), сополимером (с) (DMSO-d_6)

Fig. 3. Fragment of ^1H NMR spectrum of cefotaxime (a) and products of its interaction with succinic anhydride (b), and poly(maleic anhydride-co-vinyl acetate) (c) (DMSO-d_6)

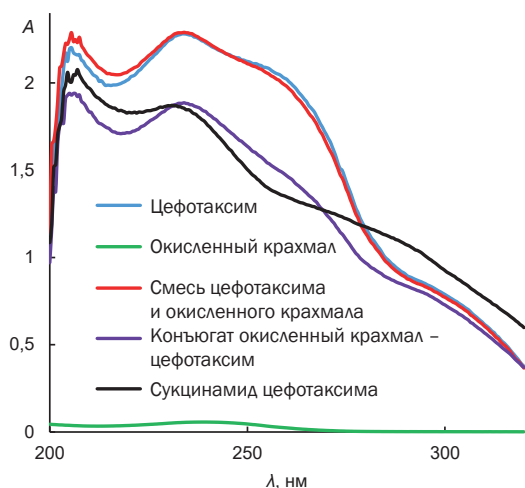


Рис. 4. Электронные спектры растворов цефотаксима, окисленного крахмала, смеси цефотаксима и окисленного крахмала, конъюгата окисленный крахмал – цефотаксим, сукцинамида цефотаксима в фосфатном буфере (pH 7,4) (цефотаксим, моль/л – $1,25 \times 10^{-4}$; окисленный крахмал, осново-моль/л – $2,5 \times 10^{-4}$)

Fig. 4. Electronic spectra of cefotaxime solutions, oxidized wheat starch, mixture of cefotaxime and oxidized starch, oxidized starch-cefotaxime conjugate, and succinamide of cefotaxime in a phosphate buffer (pH 7.4) (cefotaxime, mol/l – $1,25 \times 10^{-4}$; oxidized wheat starch, base-mol/l – $2,5 \times 10^{-4}$)

Таким образом, взаимодействие между цефотаксимом и сополимером малеинового ангидрида, в отличие от его низкомолекулярной модели – янтарного ангидрида, протекает не с образованием амидной связи по звену малеинового ангидрида, а, предположительно, как включение лекарственного вещества в полимерную матрицу за счет комплексообразования с участием amino- и карбоксильных групп цефотаксима (на что указывает наличие в ЯМР спектре сигналов протонов данных групп).

Предварительный расчет методом AM1 показал, что реакция цефотаксима со звеном малеинового

ангидрида в соотношении 1:1 невозможна из-за пространственных затруднений: молекула цефотаксима значительно больше звена сополимера, цепь сополимера не линейна, имеет большое количество кислородсодержащих групп в звеньях как малеинового ангидрида, так и винилацетата. Вследствие особенностей конфигурации молекулы цефотаксима энергетически более предпочтительным является не подход со стороны аминогруппы цефотаксима к звену малеинового ангидрида, необходимому для образования амидной связи, а взаимодействие по типу H-связи с участием нескольких атомов H цефотаксима с группами C=O звеньев винилацетата и малеинового ангидрида.

Количество продукта, выделенного после реакции сополимера с цефотаксимом, составило ~ 5 масс.%. Низкий выход и результаты ЯМР-спектроскопии показывают, что прямое амидирование сополимера является неэффективным способом получения антимикробного конъюгата. Для повышения результативности необходимо проводить активацию группы COOH (например, карбодиимидом [16]), что усложняет процесс синтеза и делает его более дорогостоящим и неэкологичным. С учетом этих обстоятельств далее исследования конъюгата цефотаксима не проводились.

В ^1H ЯМР-спектре продукта взаимодействия цефотаксима с окисленным пшеничным крахмалом подтверждением вхождения цефотаксима в состав полимера является более широкая форма сигналов протонов связанного с матрицей цефотаксима по сравнению с сигналами протонов непрореагировавшего лекарственного вещества. Ранее методом ИК-спектроскопии было показано, что о присоединении цефотаксима к матрице окисленного крахмала свидетельствует изменение формы, уширение и смещение полос C=O групп COOH и C=O β -лактамного кольца антибиотика (с 1630 до 1600 см^{-1} и с 1745 до 1760 см^{-1} соответственно); значительное уменьшение интенсивности полосы OH группы окисленного крахмала (1730 см^{-1}) [14]. Достаточно доказательными являются также результаты УФ-спектроскопии (см. рис. 4). Изучение электронных спектров исходных веществ и продукта показало, что окисленный крахмал весьма слабо поглощает в УФ-области, спектры цефотаксима и его смеси с окисленным полисахаридом практически накладываются друг на друга, тогда как поглощение конъюгата менее интенсивно, при этом вид его спектра отличается от исходных. Наблюдаемая картина аналогична полученной для спектров конъюгата цефотаксима с картофельным крахмалом [14], что вполне ожидаемо и в обоих случаях свидетельствует о присоединении цефотаксима к полимерной матрице, хотя и в разных соотношениях.

Для расчета количества лекарственного вещества, вошедшего в состав полимерной цепи, была изучена зависимость оптической плотности A при длине волны 234 нм от концентрации цефотаксима $[\text{ЦФТ}]$, в результате анализа которой получили калибровочное уравнение с высоким коэффициентом корреляции R^2 :

$$A = 18180 \times [\text{ЦФТ}] + 0,0164; R^2 = 0,9998.$$

Согласно результатам йодометрического титрования и ^1H ЯМР-спектроскопии, молярное соотношение исходных глюкозидных звеньев крахмала, диальдегидных непрореагировавших и связанных с цефотаксимом азоме-

тиновой связью, составляет 0,204:0,606:0,19. Исходя из данных о составе конъюгата, его концентрации в растворе (рассчитанной по массе навески) и величине оптической плотности с учетом приведенного калибровочного уравнения установлено, что в этом продукте содержится как конъюгированный (связанный), так и ассоциированный цефотаксим в соотношении 2:1. Выход конъюгата окисленный крахмал – цефотаксим достаточно высокий – 67 масс.%, что позволяет говорить об эффективности проведенного синтеза.

В дальнейшем методом УФ-спектроскопии изучали высвобождение цефотаксима *in vitro*. При этом оказалось, что сукцинамид цефотаксима весьма устойчив: его УФ-спектр при выдержке в среде фосфатного буфера в течение суток не изменяется, что указывает на отсутствие гидролиза амидной связи.

Результаты выхода цефотаксима из полисахаридной матричной формы с учетом вычета химически не связанного с полимерной цепью лекарственного вещества иллюстрирует рис. 5. Как можно видеть, выделение цефотаксима во всех биореlevantных средах имеет нелинейный характер; можно выделить две фазы этого процесса: быструю, продолжительностью 1–2 ч, и медленную, приближающуюся к равновесной. В щелочной среде (фосфатный буфер, буфер Трис-НСl) на первой стадии в раствор переходит более 70 масс.% цефотаксима, в физрастворе – ~ 35 масс.%, вторая стадия происходит с гораздо меньшей скоростью, при этом через 10 ч во всех средах количество высвободившегося лекарственного вещества достигает практически 100%.

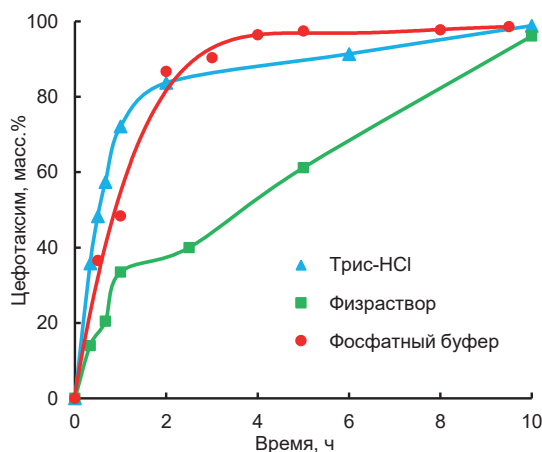


Рис. 5. Профили высвобождения цефотаксима из полисахаридной матрицы

Fig. 5. Release profiles of cefotaxime from the polysaccharide matrix

Полимер в процессе высвобождения цефотаксима постепенно набухает и находится в таком состоянии в течение наблюдаемого периода (10 ч); полное растворение полисахарида происходит по истечении недели выдержки в модельной среде, при этом разрыва полимерной цепи не происходит. Об этом свидетельствует ^1H ЯМР-спектр конъюгата окисленный крахмал – цефо-

таксим, записанный после его длительной (7–10 дней) выдержки в воде. В области 3,2–5,5 м.д., в которой проявляются химические сдвиги протонов ангидроглюкозного звена диальдегидной формы крахмала [17, 18], обнаруживаются уширенные сигналы (выделены пунктиром на рис. 6). Отсутствие характерных для моно- и дисахаридов узких сигналов, например дублетных и триплетных резонансов в области ~ 5,4 и 3,4 м.д. соответственно⁶, подтверждает высокомолекулярную природу вещества.

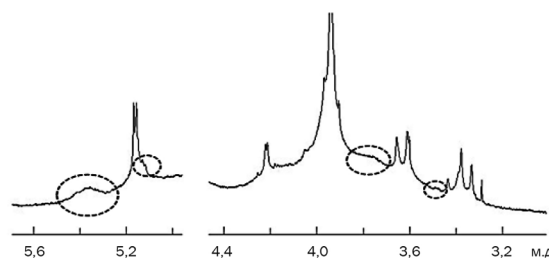


Рис. 6. Фрагменты ^1H ЯМР-спектра конъюгата окисленный крахмал – цефотаксим (D_2O)

Fig. 6. Fragments of ^1H NMR spectrum of the oxidized starch – cefotaxime conjugate (D_2O)

Известно, что в конъюгированных полимерных системах доставки высвобождение лекарственных средств включает этапы разрыва ковалентных связей и диффузии свободно движущихся частиц лекарственного вещества [19]. Обработка экспериментальных данных в координатах уравнений первого порядка и Хигучи подтверждает двухстадийный характер высвобождения цефотаксима из конъюгата (рис. 7). На первой стадии высвобождения модель Хигучи, которая описывает диффузионный характер транспорта выделенного из матрицы вещества [20], демонстрирует такую же хорошую корреляцию, как и модель первого порядка (табл. 2). Это говорит о вкладе в процесс как гидролиза азометиновой связи, так и диффузии высвободившегося цефотаксима.

Константы обоих процессов быстрой стадии k_1 и k_n пропорционально увеличиваются с ростом pH (коэффициент корреляции 0,95 и 0,81 соответственно). Это позволяет предположить, что лимитирующую роль на рассматриваемом этапе играет не массоперенос цефотаксима, а его отщепление от полимерной цепи в результате распада ковалентных связей, который катализируется гидроксильными группами.

Происходящее далее резкое понижение скорости высвобождения, очевидно, связано с уменьшением как количества гидролизующихся групп, так и подвижности молекул низкомолекулярного вещества. Об этом свидетельствует снижение в 2,8–5,5 раза значений константы первого порядка (k'_1 в табл. 2) и снижение коэффициента корреляции для модели Хигучи (см. табл. 2) соответственно. Для этой стадии также найдена линейная зависимость k'_1 от pH (R^2 0,94) при отсутствии подобной корреляции для k'_n , что указывает на основную роль гидролиза азометиновой связи на протяжении всего процесса.

Суммируя вышеизложенное, мы предполагаем следующий механизм высвобождения цефотаксима из

⁶ Тоукач Ф. Спектроскопия ЯМР в исследовании природных углеводов. Иллюстративные материалы к обзорной лекции // Toukach.ru. Режим доступа: <http://toukach.ru/rus/nmrglyco.htm> (дата обращения: 12.06.2024).

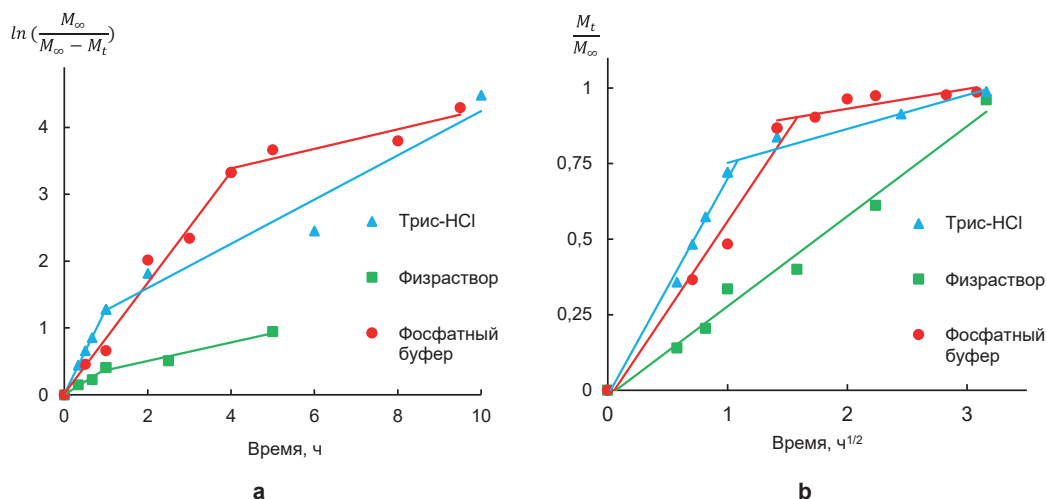


Рис. 7. Кинетические кривые высвобождения цефотаксима из конъюгата окисленный крахмал – цефотаксим, аппроксимированные с помощью математических моделей первого порядка (а) и Хигучи (b)

Fig. 7. Kinetic curves approximation of cefotaxime release from the oxidized starch – cefotaxime conjugate using mathematical models of first-order (a) and Higuchi (b)

Таблица 2. Математическое описание профилей высвобождения цефотаксима из конъюгата окисленный крахмал – цефотаксим

Table 2. Mathematical description of the release profiles of cefotaxime from the oxidized starch – cefotaxime conjugate

Кинетическая модель		pH 7,14	pH 7,4	pH 8,02
Первого порядка (уравнение (1))	$t_1, \text{ч}$	0–1	0–4	0–1
	M_t/M_∞	0–0,34	0–0,96	0–0,72
	$k_1, \text{ч}^{-1}$	$0,39 \pm 0,04$	$0,83 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,02$
	R^2	0,980	0,979	0,999
Хигучи (уравнение (2))	$t_2, \text{ч}$	1–5	4–9,5	1–10
	M_t/M_∞	0,34–0,61	0,96–0,99	0,72–0,99
	$k'_1, \text{ч}^{-1/2}$	$0,14 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,06$
	R^2	0,961	0,873	0,945
Хигучи (уравнение (2))	$t_1, \text{ч}$	0–10	0–2	0–1
	M_t/M_∞	0–0,96	0–0,87	0–0,72
	$k_H, \text{ч}^{-1/2}$	$0,30 \pm 0,02$	$0,59 \pm 0,07$	$0,72 \pm 0,04$
	R^2	0,985	0,971	0,992
Хигучи (уравнение (2))	$t_2, \text{ч}$	–	2–9,5	1–10
	M_t/M_∞	–	0,87–0,99	0,72–0,99
	$k'_H, \text{ч}^{-1/2}$	–	$0,07 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,02$
	R^2	–	0,752	0,937

его конъюгата с окисленным крахмалом. В результате контакта конъюгата с биореlevantной средой происходит гидролиз азометиновой связи в звеньях крахмала, находящихся на поверхности макрочастицы порошка конъюгата; образовавшиеся свободные молекулы цефотаксима начинают диффундировать в объем раствора. Через некоторое время, отвечающее перелому на кинетических кривых, набухание и растворение полимера приводит к повышению вязкости раствора вокруг частицы конъюгата и, как следствие, затруднению доступа к нему ионов OH^- , участвующих в гидролизе ковалентных связей окисленного крахмала – цефотаксима. Протекание этих процессов снижает массоперенос цефотаксима с поверхностного слоя матрицы. В целом такую кинетику высвобождения можно назвать смешанной и отнести ее к реакции псевдопервого порядка, осложненной вкладом диффузионных процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показывают, что реакция в растворе между цефотаксимом и сополимером малеинового ангидрида не приводит к получению антимикробного конъюгата. Матричная форма цефотаксима, в которой полимером-носителем является биоразлагаемый природный полисахарид, может рассматриваться как потенциальная система доставки антибиотика с пролонгированным высвобождением. Выделение цефотаксима из конъюгата происходит за счет гидролиза азометиновой связи, связывающей антибиотик с диальдегидом крахмала, однако также зависит от градиента диффузии лекарственного вещества с поверхности полимера в раствор. Высвобождение протекает с высокой скоростью до тех пор, пока на него не начинает оказывать тормозящее действие набухание и растворение матрицы. Кинетика высвобождения описывается реакцией псевдопервого порядка.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Bajwa N., Mahal S., Singh P.A., Jyoti K., Dewangan P., Madan J., et al. Drug – polymer conjugates: challenges, opportunities, and future prospects in clinical trials // Polymer-drug conjugates: linker chemistry, protocols and applications / eds J. Madan, A. Baldi, M. Chaudhary, N. Chopra. Cham: Springer, 2023. P. 389–469. DOI: 10.1016/B978-0-323-91663-9.00011-4.
2. Wable R.S., Jamble V.K., More A.V. Antibiotics resistance: global threat to public health // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2024. Vol. 2, no. 2. P. 1–9. DOI: 10.5281/zenodo.10602984.
3. Kamaruzzaman N.F., Tan L.P., Hamdan R.H., Choong S.S., Wong W.K., Gibson A.J., et al. Antimicrobial polymers: the potential replacement of existing antibiotics? // International Journal of Molecular Sciences. 2019. Vol. 20, no. 11. P. 2747. DOI: 10.3390/ijms20112747.
4. Vilar G., Tulla-Puche J., Albericio F. Polymers and drug delivery systems // Current Drug Delivery. 2012. Vol. 9, no. 4. P. 367–394. DOI: 10.2174/156720112801323053.
5. Sung Y.K., Kim S.W. Recent advances in polymeric drug delivery systems // Biomaterials Research. 2020. Vol. 24. P. 12. DOI: 10.1186/s40824-020-00190-7.
6. Tudu M., Samanta A. Natural polysaccharides: chemical properties and application in pharmaceutical formulations // European Polymer Journal. 2023. Vol. 184. P. 111801. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111801.
7. Nagaraja A., Jalageri M.D., Puttaiahgowda Y.M., Reddy K.R., Raghu A.V. A review on various maleic anhydride antimicrobial polymers // Journal of Microbiological Methods. 2019. Vol. 163. P. 105650. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.105650.
8. Wal K., Stawiński W., Dmochowska A., Rutkowski P. Advanced antimicrobial materials and applications: maleic anhydride antimicrobial polymers // Advanced antimicrobial materials and applications / eds Inamuddin, M.I. Ahmed, R. Prasad. Singapore: Springer, 2020. P. 171–192. DOI: 10.1007/978-981-15-7098-8_7.
9. Münster L., Fojtů M., Capáková Z., Muchová M., Musilová L., Vaculovič T., et al. Oxidized polysaccharides for anticancer-drug delivery: what is the role of structure? // Carbohydrate Polymers. 2021. Vol. 257. P. 117562. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117562.
10. Falsafi S.R., Topuz F., Rostamabadi H. Dialdehyde carbohydrates – advanced functional materials for biomedical applications // Carbohydrate Polymers. 2023. Vol. 321. P. 121276. DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.121276.
11. Yong H., Liu J. Recent advances on the preparation conditions, structural characteristics, physicochemical properties, functional properties and potential applications of dialdehyde starch: a review // International Journal of Biological Macromolecules. 2024. Vol. 259. Part 1. P. 129261. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129261.
12. Tyurina T.G., Kryuk T.V. Modification of maleic anhydride copolymers with aliphatic alkylamines and sulfanilamide // Russian Journal of Applied Chemistry. 2019. Vol. 92, no. 3. P. 351–359. DOI: 10.1134/S1070427219030054. EDN: VQTDTA.
13. Moghadam P.N., Azaryan E., Zeynizade B. Investigation of poly(styrene-alt-maleic anhydride) copolymer for controlled drug delivery of ceftriaxone antibiotic // Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry. 2010. Vol. 47, no. 8. P. 839–848. DOI: 10.1080/10601325.2010.492265.
14. Крюк Т.В., Тюрина Т.Г., Кудрявцева Т.А. Конъюгат натрия цефотаксима с картофельным крахмалом как потенциальная система доставки антибактериального средства // Химико-фармацевтический журнал. 2021. Т. 55. N 8. С. 50–54. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-8-50-54. EDN: PSOTWZ.
15. Bayer I.S. Controlled drug release from nanoengineered polysaccharides // Pharmaceutics. 2023. Vol. 15, no. 5. P. 1364. DOI: 10.3390/pharmaceutics15051364.
16. Karakus G., Ece A., Yagliglu A.S., Zengin H.B., Karahan M. Synthesis, structural characterization, and antiproliferative/cytotoxic effects of a novel modified poly(maleic anhydride-co-vinyl acetate)/doxorubicin conjugate // Polymer Bulletin. 2017. Vol. 74. P. 2159–2184. DOI: 10.1007/s00289-016-1821-1.
17. Chauhan K., Kaur J., Kumari A., Kumari A., Chauhan G.S. Efficient method of starch functionalization to bis-quaternary structure unit // International Journal of Biological Macromolecules. 2015. Vol. 80. P. 498–505. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.07.011.
18. Tessanan W., Phinyocheep P., Amornsakchai T. Development of biodegradable thermosetting plastic using dialdehyde pineapple stem starch // Polymers. 2023. Vol. 15, no. 18. P. 3832. DOI: 10.3390/polym15183832.
19. Kalosakas G. Interplay between diffusion and bond cleavage reaction for determining release in polymer – drug conjugates // Materials. 2023. Vol. 16, no. 13. P. 4595. DOI: 10.3390/ma16134595.
20. Siepmann J., Peppas N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) // Advanced Drug Delivery Reviews. 2001. Vol. 48, no. 2-3. P. 139–157. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00112-0.

REFERENCES

1. Bajwa N., Mahal S., Singh P.A., Jyoti K., Dewangan P., Madan J., et al. Drug–polymer conjugates: challenges, opportunities, and future prospects in clinical trials. In: Madan J., Baldi A., Chaudhary M., Chopra N. (eds). *Polymer-drug conjugates: linker chemistry, protocols and applications*. Cham: Springer; 2023, p. 389–469. DOI: 10.1016/B978-0-323-91663-9.00011-4.
2. Wable R.S., Jamble V.K., More A.V. Antibiotics resistance: global threat to public health. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2024;2(2):1-9. DOI: 10.5281/zenodo.10602984.
3. Kamaruzzaman N.F., Tan L.P., Hamdan R.H., Choong S.S., Wong W.K., Gibson A.J., et al. Antimicrobial polymers: the potential replacement of existing antibiotics? *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(11):2747. DOI: 10.3390/ijms20112747.
4. Vilar G., Tulla-Puche J., Albericio F. Polymers and drug delivery systems. *Current Drug Delivery*. 2012;9(4):367-394. DOI: 10.2174/156720112801323053.
5. Sung Y.K., Kim S.W. Recent advances in polymeric drug delivery systems. *Biomaterials Research*. 2020;24:12. DOI: 10.1186/s40824-020-00190-7.

6. Tudu M., Samanta A. Natural polysaccharides: chemical properties and application in pharmaceutical formulations. *European Polymer Journal*. 2023;184:111801. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111801.
7. Nagaraja A., Jalageri M.D., Puttaiahgowda Y.M., Reddy K.R., Raghu A.V. A review on various maleic anhydride antimicrobial polymers. *Journal of Microbiological Methods*. 2019;163:105650. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.105650.
8. Wal K., Stawiński W., Dmochowska A., Rutkowski P. Advanced antimicrobial materials and applications: maleic anhydride antimicrobial polymers. In: Inamuddin, Ahamed M.I., Prasad R. (eds). *Advanced antimicrobial materials and applications*. Singapore: Springer; 2020, p. 171-192. DOI: 10.1007/978-981-15-7098-8_7.
9. Münster L., Fojtů M., Čapáková Z., Muchová M., Musilová L., Vaculovič T., et al. Oxidized polysaccharides for anticancer-drug delivery: what is the role of structure? *Carbohydrate Polymers*. 2021;257:117562. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117562.
10. Falsafi S.R., Topuz F., Rostamabadi H. Dialdehyde carbohydrates – advanced functional materials for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. 2023;321:121276. DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.121276.
11. Yong H., Liu J. Recent advances on the preparation conditions, structural characteristics, physicochemical properties, functional properties and potential applications of dialdehyde starch: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;259:129261. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129261.
12. Tyurina T.G., Kryuk T.V. Modification of maleic anhydride copolymers with aliphatic alkylamines and sulfanilamide. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2019;92(3):351-359. DOI: 10.1134/S1070427219030054. EDN: VQTDTA.
13. Moghadam P.N., Azaryan E., Zeynizade B. Investigation of poly(styrene-alt-maleic anhydride) copolymer for controlled drug delivery of ceftriaxone antibiotic. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*. 2010;47(8):839-848. DOI: 10.1080/10601325.2010.492265.
14. Kryuk T.V., Tyurina T.G., Kudryavtseva T.A. Sodium cefotaxime – potato starch conjugate as a potential system for antibacterial drug delivery. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*. 2021;55(8):50-54. (In Russian). DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-8-50-54. EDN: PSOTWZ.
15. Bayer I.S. Controlled drug release from nanoengineered polysaccharides. *Pharmaceutics*. 2023;15(5):1364. DOI: 10.3390/pharmaceutics15051364.
16. Karakus G., Ece A., Yaglioglu A.S., Zengin H.B., Karahan M. Synthesis, structural characterization, and antiproliferative/cytotoxic effects of a novel modified poly(-maleic anhydride-co-vinyl acetate)/doxorubicin conjugate. *Polymer Bulletin*. 2017;74:2159-2184. DOI: 10.1007/s00289-016-1821-1.
17. Chauhan K., Kaur J., Kumari A., Kumari A., Chauhan G.S. Efficient method of starch functionalization to bis-quaternary structure unit. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015;80:498-505. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.07.011.
18. Tessanan W., Phinyocheep P., Amornsakchai T. Development of biodegradable thermosetting plastic using dialdehyde pineapple stem starch. *Polymers*. 2023;15(18):3832. DOI: 10.3390/polym15183832.
19. Kalosakas G. Interplay between diffusion and bond cleavage reaction for determining release in polymer – drug conjugates. *Materials*. 2023;16(13):4595. DOI: 10.3390/ma16134595.
20. Siepmann J., Peppas N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;48(2-3):139-157. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00112-0.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Тюрина Татьяна Григорьевна,
д.х.н., заведующий отделом,
Институт физико-органической химии
и углехимии им. Л.М. Литвиненко,
283048, Донецкая Народная Республика,
г. Донецк, ул. Розы Люксембург, 70,
Российская Федерация,
t_turina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2950-3616>

Крюк Татьяна Владленовна,
к.х.н., доцент,
старший научный сотрудник,
Институт физико-органической химии
и углехимии им. Л.М. Литвиненко,
283048, Донецкая Народная Республика,
г. Донецк, ул. Розы Люксембург, 70,
Российская Федерация,
ktvl2010@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8538-5856>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Tatyana G. Tyurina,
Dr. Sci. (Chemistry), Head of Department,
L.M. Litvinenko Institute of Physical Organic
and Coal Chemistry,
70, Rosa Luxemburg St., Donetsk,
Donetsk People's Republic, 283048,
Russian Federation,
t_turina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2950-3616>

Tatyana V. Kryuk,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Senior Researcher,
L.M. Litvinenko Institute of Physical Organic
and Coal Chemistry,
70, Rosa Luxemburg St., Donetsk,
Donetsk People's Republic, 283048,
Russian Federation,
ktvl2010@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8538-5856>

Шевчук Наталья Олеговна,
младший научный сотрудник,
Институт физико-органической химии
и углехимии им. Л.М. Литвиненко,
283048, Донецкая Народная Республика,
г. Донецк, ул. Розы Люксембург, 70,
Российская Федерация,
✉ minarina@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0007-3861-0794>

Вклад авторов

Т.Г. Тюрина – постановка задачи,
разработка концепции исследования,
обсуждение результатов.
Т.В. Крюк – проведение экспериментов,
обработка полученных данных, обсуждение
результатов, написание текста статьи.
Н.О. Шевчук – проведение экспериментов,
обработка полученных данных,
обсуждение результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 28.06.2024.
Одобрена после рецензирования 19.09.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

Natalia O. Shevchuk,
Junior Researcher,
L.M. Litvinenko Institute of Physical Organic
and Coal Chemistry
70, Rosa Luxemburg St., Donetsk,
Donetsk People's Republic, 283048,
Russian Federation,
✉ minarina@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0007-3861-0794>

Contribution of the authors

Tatyana G. Tyurina – problem formulation,
research concept development,
results discussion.
Tatyana V. Kryuk – conducting experiments,
data processing, results discussing,
writing the text of manuscript.
Natalia O. Shevchuk – conducting experiments,
data processing, results discussing.

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 28.06.2024.
Approved after reviewing 19.09.2024
Accepted for publication 30.11.2024.

Научная статья
УДК 547.913:66.011:677.027.6
EDN: FQLQAT
DOI: 10.21285/achb.944



Эмульсионные микро- и нанокапсулы в системе концентрат лактоглобулина / пектин с эфирным маслом лаванды *Lavandula angustifolia*, стабилизированные ультразвуком

Ш.Р. Алиева***, Г.А. Кодирова*, З.У. Шерова*,
С.Р. Усманова*, З.К. Мухидинов*✉

*Институт химии им. В.И. Никитина Национальной академии наук Таджикистана,
Душанбе, Республика Таджикистан

**Научно-исследовательский центр экологии и окружающей среды Центральной Азии,
Душанбе, Республика Таджикистан

Аннотация. В последние годы стремительно растет интерес к применению биоактивных соединений, выделенных из растительных источников, в качестве ингредиентов для функциональных пищевых продуктов и фармацевтических препаратов. Известно, что пищевая матрица, размер молекулы, внешние факторы и среда желудочно-кишечного тракта могут препятствовать биодоступности и абсорбции этих биоактивных соединений в организме. Защита данных соединений с помощью технологии наноинкапсуляции может повысить их стабильность. Представленная работа посвящена исследованию применения системы доставки на основе эмульсионных микро- и нанокапсул для защиты биоактивных соединений (эфирных масел) и изучению ультразвукового влияния различной амплитуды на стабильность эмульсионных микрокапсул в системе белок / пектин с эфирным маслом. Были вычислены: средний размер полученных микрокапсул, дзета-потенциал, удельная поверхность частиц и вязкость дисперсной системы. Показано, что действие ультразвука инициирует образование пектинового слоя с разной плотностью заряда на поверхности частиц эмульсии в зависимости от приложенной силы ультразвука. Найдено оптимальное значение амплитуды ультразвука, способствующее формированию частиц со средним размером и с высокой удельной поверхностью 32967 см² на 1 мл эмульсии. Полученные нано- и микрочастицы с эфирным маслом показали хорошую антимикробную, антигрибковую и антивирусную активность. Разработанные системы доставки на основе пищевых биополимеров с выявленными характеристиками вполне могут соответствовать требованиям рынка антибактериальных препаратов и найти свое применение в области создания функциональных продуктов.

Ключевые слова: нано- и микроэмульсия, эфирное масло, пектин, концентрат лактоглобулина, ультразвук, размер частиц

Для цитирования: Алиева Ш.Р., Кодирова Г.А., Шерова З.У., Усманова С.Р., Мухидинов З.К. Эмульсионные микро- и нанокапсулы в системе концентрат лактоглобулина / пектин с эфирным маслом лаванды *Lavandula angustifolia*, стабилизированные ультразвуком // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 482–494. DOI: 10.21285/achb.944. EDN: FQLQAT.

Emulsion micro- and nanocapsules of the lactoglobulin concentrate / pectin system with essential oil of *Lavandula angustifolia* stabilized by ultrasound

Shakhnozabonu R. Alieva^{*,**}, Gulru A. Qodirova^{*}, Zamira U. Sherova^{*},
Surayo R. Usmanova^{*}, Zayniddin K. Muhidinov^{*✉}

^{*}*Institute of Chemistry named after V.I. Nikitin, National Academy of Sciences of Tajikistan, Dushanbe, Republic of Tajikistan*

^{**}*Research Center for Ecology and Environment of Central Asia, Dushanbe, Republic of Tajikistan*

Abstract. Recent years have seen a rapidly growing interest in the use of plant-isolated bioactive compounds as ingredients in functional food and pharmaceuticals. It is known that food matrix, molecular size, external factors, and gastrointestinal environment can interfere with the bioavailability and absorption of such bioactive compounds in the body. The protection of specified compounds via nanoencapsulation technology can improve their stability. The present work is aimed at studying the application of a delivery system based on emulsion micro- and nanocapsules in the protection of bioactive compounds (essential oils), as well as examining the effect of ultrasound of different amplitudes on the stability of emulsion microcapsules in the protein/pectin system with essential oil. The following parameters were determined: average size of obtained microcapsules, zeta potential, specific surface area of the particles, and viscosity of the disperse system. Ultrasound is shown to initiate the formation of a pectin layer, with the charge density varying on the surface of emulsion particles depending on the applied ultrasonic force. The article presents the optimal ultrasound amplitude for the formation of medium-sized particles having a high specific surface area of 32967 cm² per 1 mL of the emulsion. The obtained nano- and microparticles with essential oil exhibit good antimicrobial, antifungal, and antiviral activities. The developed delivery systems based on food biopolymers with identified characteristics may well meet the requirements of the antibacterial drugs market and find their application in the field of functional food development.

Keywords: nano- and microemulsion, essential oil, pectin, lactoglobulin concentrate, ultrasound, particle size

For citation: Alieva Sh.R., Qodirova G.A., Sherova Z.U., Usmanova S.R., Muhidinov Z.K. Emulsion micro- and nanocapsules of the lactoglobulin concentrate / pectin system with essential oil of *Lavandula angustifolia* stabilized by ultrasound. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):482-494. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.944. EDN: FQLQAT.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время исследователи сосредоточены на важности биоактивных соединений природного происхождения, которые представляют собой вторичные метаболиты, полученные из семян, продуктов питания и продуктов метаболизма на основе ферментации. Растет интерес к использованию биоактивных компонентов, выделенных из растительных источников, в качестве ингредиентов для функциональных пищевых продуктов и фармацевтических препаратов [1–3]. Утверждается, что многие из этих биоактивных фитохимических веществ способствуют здоровью и благополучию человека, улучшая его физическую или умственную работоспособность. Кроме того, они хорошо известны своим широким спектром полезных действий, включая антиоксидантное, противовоспалительное, антимикробное, противораковое, противовирусное и ранозаживляющее, потому могут стать компонентами функциональных пищевых добавок [1–6].

В то же время многие биоактивные соединения нерастворимы в воде и очень чувствительны к раз-

личным стрессовым факторам окружающей среды, воздействующим на них во время обработки и хранения пищевых продуктов, таким как тепло, свет и кислород воздуха, что ограничивает их применение в качестве нутриентов. Отмечается, что действие указанных факторов и связь с желудочно-кишечной средой могут препятствовать биодоступности и абсорбции этих биоактивных соединений в системах клеток-хозяев и на поврежденных участках организма [3, 7–9].

Кроме того, существует множество проблем, связанных с разработкой новых и более эффективных функциональных пищевых продуктов, обогащенных чистыми биологически активными соединениями в биологических составах, из-за их особых характеристик, то есть плохой биодоступности, неприятного вкуса, плохой растворимости, слабой физической и химической стабильности, обнаруживающейся при обработке и хранении пищевых продуктов. Для преодоления этих проблем существуют новые системы инкапсуляции и доставки с использованием липидных оболочек, эмульсионные нано- и микрокапсулы на основе биополимеров и физи-

ческие методы, например распылительная сушилка, электропрядение (электроспиннинг) [3, 10–13].

В указанном плане потенциал белково-полисахаридного комплекса как пищевого средства инкапсуляции и доставки биоактивных соединений, питательных веществ и лекарств привлек большое внимание в области пищевой, косметической и фармацевтической промышленности [10–14]. Полисахариды широкодоступны и имеют различную структуру с различными преимуществами, в том числе низкой токсичностью, легкоусвояемы, биосовместимы и могут оставаться стабильными в широком диапазоне pH и температур. Известно, что белки по своей природе являются поверхностно-активными веществами и благодаря своей амфифильной природе действуют как эмульгаторы, тогда как полисахариды с гидрофильной природой могут действовать как загустители и стабилизаторы [12–16]. Взаимодействие между белками и полисахаридами является естественным явлением в пищевых системах для улучшения текстуры, стабильности и качества широкого спектра коллоидных систем, включая эмульсии, гели, дисперсии, пены и их смешанные варианты [14].

Белково-полисахаридные наноструктуры обычно создаются в наномасштабе (менее 1000 нм) и могут иметь разнообразные морфологию и свойства в зависимости от материала, используемого в их конструкции. Небольшой размер этих наноструктур дает различные преимущества по сравнению с обычными системами доставки благодаря более высокому соотношению площади поверхности и объема, а также точному целенаправленному и контролируемому высвобождению загруженных биоактивных соединений и других активных агентов в кишечном пространстве [3–5, 10–18]. Наноструктуры могут улучшать некоторые органолептические свойства (например, маскировать нежелательные запахи), повышать биодоступность, предотвращать окислительные реакции, сохранять биологическую активность и контролировать высвобождение биологически активных веществ или даже повышать их качество и стабильность, а также повышать их биологическую активность за счет снижения размеров материалов в наномасштабе [3–5, 11, 15].

Липофильные биологически активные соединения (эфирные масла, жирные кислоты, каротиноиды и др.) в пищевых продуктах также чувствительны к деградации под воздействием раздражителей окружающей среды, во время обработки, хранения и прохождения через желудочно-кишечный тракт. Эфирные масла имеют очень сложный химический состав, который включает преимущественно терпены, терпеноиды и фенилпропаноиды – эти основные компоненты эфирных масел составляют примерно 70% его состава. Оставшаяся часть содержит множество других соединений, таких как жирные кислоты, оксиды и производные серы, алдегиды и полифенолы [2, 19]. Известно, что защитная активность эфирного масла или его компонентов связана с сохранением антиоксидантной, антимикробной и противовоспалительной активности [19–24].

В индустрии ароматизаторов и отдушек наблюдался значительный рост продаж некоторых натуральных материалов во время вспышки коронавирусной инфекции COVID-19. Эфирные масла показали различную фармакологическую активность, в том числе и противо-

вирусную, поэтому предполагается, что они обладают потенциальной продуктивностью против SARS-CoV-2. В работе [25] отмечено, что благодаря своей липофильности эфирные масла могут легко проникать через вирусную оболочку и вызывать ее разрыв.

Авторами работы [26] проверены ингибирующие свойства 538 образцов эфирных масел, ароматических экстрактов и их фракций в отношении двух очень хорошо охарактеризованных протеаз (M^{pro}) и (PL^{pro}), которые являются мишенями для лекарственных средств и играют ключевую роль в репликации и транскрипции вируса SARS-CoV-2. Эфирные масла с высоким содержанием монотерпенов и монотерпеноидов проявили низкую ингибирующую активность. Они обнаружили четкие различия, например, между эфирными маслами корня и листьев растений, где первое проявляет более высокую ингибирующую активность в отношении указанных протеаз SARS-CoV-2 [26].

Защита эфирных масел с помощью технологии наноинкапсуляции может повысить их стабильность. Технология наноинкапсуляции обеспечивает контролируемое высвобождение активных компонентов благодаря набуханию или деградации полисахаридной оболочки. Это способствует усилению антибактериальных свойств эфирных масел, снижению их чувствительности к различным факторам окружающей среды, а также уменьшению их влияния на вкус пищи. Следовательно, применение системы доставки на основе коллоидов может повышать растворимость, стабильность и биодоступность этих липофильных биоактивных соединений.

Целью проведенной работы являлось получение стабильных нано- и микрокапсул эфирных масел на основе белково-полисахаридного комплекса посредством изучения влияния ультразвуковой волны различной амплитуды на размер частиц и стабильность эмульсионных микрокапсул.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы исследования. Эфирные масла были получены из растения лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia*), выращенной на экспериментальных участках Института ботаники, физиологии и генетики растений Национальной академии наук Таджикистана (ИБФГР НАНТ) и Института зоологии и паразитологии Национальной академии наук Таджикистана (ИЗП НАНТ). Для получения и стабилизации микро- и наноэмульсий в данной работе были использованы: низкометилированный пектин, полученный из яблочных выжимок, с содержанием галактуроновой кислоты 58,6%, степенью этерификации 38,0% и молекулярной массой M_w 119 кДа (далее обозначенный как низкометилированный яблочный пектин (НМЯ)) [27], а также концентрат лактоглобулина (LgC), выделенный из молочной сыворотки [28], содержащий 37,35% β -LgA, 52,9% β -LgB и 9,7% α -LgA. Растворы пектина и лактоглобулина перед использованием очищали на лабораторной ультрафильтрационной системе (мембранная система KrossFlow, США) в режиме диультрафильтрации с применением соответствующих мембран.

Все растворители и реагенты, использованные в этих экспериментах, такие как хлорид натрия, буферные соли, этанол и др., были химически чистыми.

Получение нано- и микрокапсул в системе концентрат лактоглобулина / низкометилованный яблочный пектин с эфирным маслом лаванды. Эмульсионные нано- и микрокапсулы получали по методике, описанной в работе [29], с некоторыми изменениями: в емкость, размещенную на водяной бане при температуре 60 °С, вносили 1–2 мл эфирного масла лаванды, предварительно разведенного в 2–3 мл подсолнечного масла («Олейна», Россия), и при перемешивании на цифровом гомогенизаторе IKA T-25 (Ultra Turrax, IKA-Werke GmbH & Co.KG, Германия) при скорости 12 тыс. об/мин добавляли 10 мл 0,4%-го водного раствора концентрата лактоглобулина молочной сыворотки. После 15 мин, не прерывая перемешивание, медленно (по каплям) добавляли рассчитанное количество 0,2%-го раствора яблочного пектина, растворенного в 0,1 М NaCl для получения вторичной эмульсии, и продолжили перемешивание еще 20 мин.

Ультразвуковая обработка. Далее полученная эмульсия была подвергнута действию ультразвука (EW-04714-53 Cole Parmer, США) с рабочей частотой 20 кГц и мощностью 130 Вт в течение 5–10 мин путем погружения ультразвукового пробника в эмульсию при различных амплитудах ультразвука (30, 50 и 70%). Перед обработкой ультразвуком эмульсионные микрокапсулы предварительно смешивали в химическом стакане с помощью магнитной мешалки. Мощность ультразвуковой волны была определена параллельно колориметрически при повышении температуры от 20 до 60 °С. Все эксперименты проводились трижды с использованием свежеприготовленных эмульсий, результаты представлены как средне-стандартно вычисленные.

Характеристика эмульсионных микрочастиц. Эмульсии хранили при комнатной температуре в течение 24 ч, затем проводили оценку устойчивости по объему, количеству микрокапсул в 1 мл, размеру и распределению частиц микроскопическим методом. Количество частиц и их размеры определялись с помощью микроскопа Olympus BX53 (Olympus U-TR30-2, Япония). Для вычисления значений средних диаметров $d_{3,2}$ и $d_{4,3}$, характеризующих средневзвешенные размеры по массе и объему эмульсионных частиц, использовалась программа MS Excel. Все измерения проводились на трех свежеприготовленных образцах, данные представлены в виде средних значений.

Удельная поверхность капель масел в эмульсиях УП, $\text{см}^2 \times \text{г}^{-1}$, которая представляет собой площадь поверхности раздела масло – вода на единицу массы масла, была рассчитана с использованием следующего выражения [30]:

$$\text{УП} = 6 / (\rho_o \times d_{3,2}),$$

где ρ_o – плотность масляной фазы, $\text{г} \times \text{см}^{-3}$; $d_{3,2}$ – средневзвешенный диаметр капли, мкм.

Определение дзета-потенциала микрочастиц. Дзета-потенциал измеряли по принципу электрофореза с использованием электрофоретической ячейки (ISCO, США) с капилляром из стекла, покрытым полидиметилсилоксаном (слоем толщиной 250 мкм), и рассчитывали на основе модели Смолуховского [31]. Перед введением исследуемого раствора в аппарат микроканальную ячейку и всю линию растворов промывали в двух направлениях би-дистиллированной водой несколько раз для удаления любых загрязнений (таких как электролиты, оставшиеся

после предыдущих экспериментов). После этого был инициирован второй 15-минутный цикл промывки с использованием рабочих эмульсий. Прозрачность поверхностей микроканалов позволяла визуально осматривать канал, чтобы убедиться, что все пузырьки удалены. Все образцы перед анализом разбавляли 5 мМ фосфатным буфером (рН = 7,0) и перемешивали с использованием магнитной мешалки при 300 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре, чтобы избежать эффектов многократного рассеяния. Для разделения в ячейке было установлено напряжение (400 В) на время не более 1 мин, после чего отключали питание и извлекали электроды из микроканальной ячейки. Все эксперименты повторяли в трехкратной повторности и проводили при комнатной температуре 25 °С.

Определение вязкости эмульсии. Измерения сдвиговой вязкости проводились с использованием реометра (цифровой вискозиметр Brookfield HBDE-V, США), оснащенного UL-адаптером, и при скорости сдвига в диапазоне от 0,1 до 100 с^{-1} при температуре $25,0 \pm 0,1$ °С.

Оценка стабильности эмульсии. Для изучения кинетики фазового разделения сразу после добавления всех компонентов эмульсии ($18 \pm 0,5$ мл) разливались в градуированные стеклянные пробирки объемом 25 мл. Пробирки закрывались шлифованными крышками и хранились при комнатной температуре. Объем кажущейся стабильной эмульсии без слоя густого крема контролировался ежедневно в течение 2 недель.

Статистический анализ данных. Все эксперименты проводили с использованием трех свежеприготовленных образцов. Полученные результаты представляют собой средние значения и стандартные отклонения, которые были рассчитаны с использованием t -критерия Стьюдента для независимых выборок в программе Microsoft Excel.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эфирные масла из растений *L. Angustifolia* экстрагировали гидродистилляционным методом с использованием аппарата Клевенджера в течение 90 мин. Эфирные масла растений *L. Angustifolia* представляют бледно-желтую жидкость со специфическим запахом. Выход эфирных масел (в процентах от массы воздушно-сухого сырья) и основные физические свойства полученных масел из двух источников представлены в табл. 1.

Таблица 1. Выход и физические свойства эфирных масел, полученных из двух источников растений *Lavandula Angustifolia*, произрастающих в Таджикистане

Table 1. Yield and characteristic of essential oils obtained from two sources of *Lavandula Angustifolia* plants growing in Tajikistan

Название и источник растения	Выход масла, %	Плотность, $\text{г}/\text{см}^3$	Коэффициент преломления света при 20 °С
Эфирное масло лаванды ИБФГР НАНТ, 2020 г.	0,82	0,873	1,459
Эфирное масло лаванды ИЗП НАНТ, 2020 г.	1,18	0,879	1,464

Из данных табл. 1 следует, что выход эфирного масла лаванды, полученного на экспериментальном участке ИЗП НАНТ, больше (1,18%) по сравнению с выходом масла, полученного на участке ИБФГР НАНТ, хотя они имели почти одинаковые физические свойства по плотности и коэффициенту преломления света. В дальнейших экспериментах по получению эмульсии были использованы образцы масла первого участка.

По нашим неопубликованным данным, в составе образцов с участков ИБФГР НАНТ и ИЗП НАНТ обнаружены 64 и 98 летучих соединений соответственно. В составе эфирного масла ИБФГР НАНТ найдены: линалоол (33,27%), линалилацетат (21,01%), (-)-4-терпинеол (6,89%), α -терпинеол (6,62%), 4-гексен-1-ол (4,91%), геранилацетат и его изомер (4,32%), эукалиптол (1,88%), а также транс- β -оцимен (2,24%). Состав эфирного масла ИЗП НАНТ отличался содержанием в нем оксида кариофиллена (3,54%), лавандулола (3,97%) и ряда новых соединений.

Согласно данным работы [32], в растении *L. Angustifolia*, произрастающем в Таджикистане, было идентифицировано 59 соединений – в основном линалоол (31,44%), линалилацетат (31,78%), α -терпинеол (8,43%), лавандулол (5,24%), эукалиптол (1,48%) и *b*-фарнесен (1,35%).

По данным другого источника [33], в растении *L. Angustifolia*, произрастающем в Египте, было идентифицировано 28 соединений в различных пропорциях. Химический состав эфирного масла, описанного в данной работе, был сравнен с составом масла в источнике [32] и содержал: линалоол (31,1%), линалилантринилат (16,8%), бензилацетат (12,9%) и 1,8-цинеол (10,1%). Другие компоненты были идентифицированы в промежуточных пропорциях, включая ацетат α -терпинеола (4,92%), α -терпинеол (3,89%), терп-4-ол (3,15%), α -пинен (2,85%), дигидрокарвеол (2,34%), дигидромирцен (1,81%), лимонен (1,04%); остальные компоненты присутствовали в незначительных количествах.

Как было отмечено выше, инкапсулирование эфирных масел может улучшать органолептические свойства, повышать биодоступность, предотвращать окислительные реакции, сохранять биологическую активность и контролировать высвобождение биологически активных веществ. В данном исследовании были использованы разработанные нами системы доставки лекарственных веществ и пищевых ингредиентов на основе эмульсии типа масло в воде стабилизированными белком и пектином [18].

Нано- и микрокапсулы эфирных масел, стабилизированные доступными биополимерами (концентрат лактоглобулина молочной сыворотки и яблочного пектина), получали методом двухстадийного формирования в эмульсии типа масло в воде в присутствии противоионов натрия, как описано в работах [18, 29]. В данной работе мы использовали эмульсионные системы с LgC/НМЯ, так как нано- и микрокапсулы с низкометилованным пектином имели несколько высокий захват масла по сравнению с высокометилованными пектинами из цитрусовых, подсолнечника и яблок [18].

Таким образом, нами были найдены оптимальные условия получения стабильных нано- и микрокапсул в эмульсионной системе масло/вода при различных соотношениях LgC и НМЯ с минимальным размером,

эффективно захватывающие масляные частицы. В связи с этим для инкапсулирования эфирных масел в данной работе была выбрана система LgC/НМЯ с молярным соотношением 40:1.

Стабильность эмульсии против агрегации капель, покрытых белком, можно улучшить путем добавления одного или нескольких полисахаридов для покрытия протеинового слоя и увеличения их стабильности. Кроме того, для улучшения стабильности эмульсии существуют различные физические методы: пульсирующее электрическое поле [34], ультразвук [35, 36] и др. Результаты этих исследований показали, что действие пульсирующего электрического поля и ультразвуковой волны при найденных оптимальных условиях способствует раскрытию структуры белка и образованию более мелких агрегатов, тем самым предотвращает агрегацию капель и их коалесценцию и/или флокуляцию.

Нами изучено влияние амплитуды ультразвука на стабильность нано- и микрокапсул, размер частиц и их распределение в объеме эмульсии. Для получения информации о размере частиц проведена калибровка полученной на микроскопе области изображения одной капли разбавленной эмульсии. Количество микрокапсул и их размеры были определены с помощью компьютерной программы Olympus cellSens Standard. На основе полученных данных о размерах и объеме частиц были построены кривые распределения частиц микрокапсул.

На рис. 1 представлены кривые распределения (зависимость объемной доли микрокапсул от их размера) в эмульсионной системе LgC/НМЯ микрокапсул, содержащих эфирное масло лаванды, под действием ультразвука различной амплитуды: 30, 50 и 70%. Размеры частиц полученных эмульсий находились в пределах от 450 нм до 10,5 мкм.

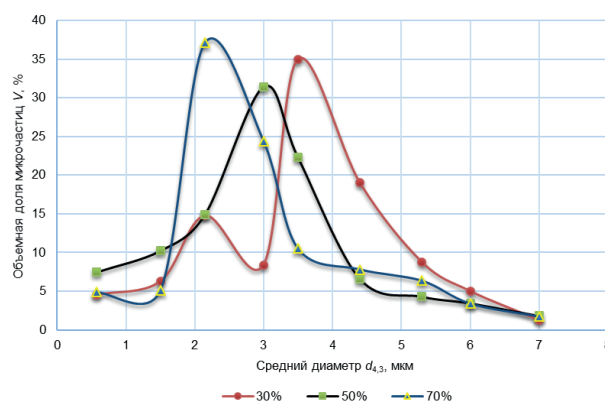


Рис. 1. Кривые распределения в эмульсионной системе концентрат лактоглобулина / яблочный пектин микрокапсул, содержащих эфирное масло лаванды, под действием ультразвука амплитуды 30, 50 и 70%

Fig. 1. Distribution curves of microparticles in the emulsion system of lactoglobulins concentrate / apple pectin containing lavender essential oil under the influence of ultrasound of amplitudes 30, 50 and 70%

Из кривых распределения в эмульсионной системе LgC/НМЯ микрокапсул, содержащих эфирное масло лаванды, видно, что полученные эмульсии под действием силы ультразвука с повышением амплитуды проявляют

бимодальное распределение частиц, плавно переходящее в мономодальное с возрастанием амплитуды ультразвука до 50 и 70%. При этом максимальный объем частиц с минимальным размером 2–3 мкм при действии ультразвука становится преобладающим (см. рис. 1).

На рис. 2 представлен средний диаметр микрокапсул $d_{4,3}$ в зависимости от приложенной амплитуды ультразвука 30, 50 и 70%. Как видно из рис. 2, с возрастанием силы ультразвука размеры эмульсионных частиц плавно уменьшаются, а минимальное значение $d_{4,3}$ можно достичь при 70%-й амплитуде ультразвукового воздействия на эмульсионные микрочастицы. Дальнейшее увеличение амплитуды ультразвука было нецелесообразно с точки зрения расхода энергии.

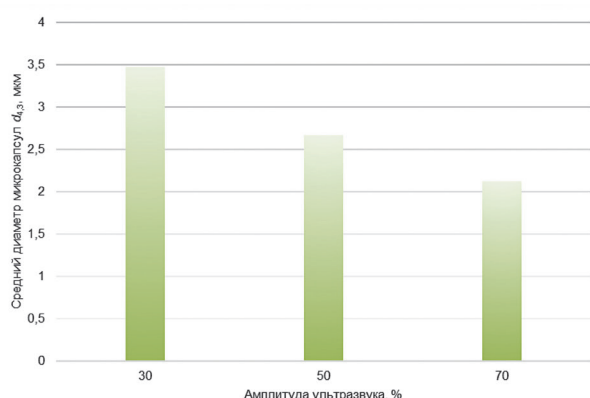


Рис. 2. Зависимость среднего диаметра микрокапсул от приложенной амплитуды ультразвука 30, 50 и 70%

Fig. 2. Relationship between the average diameter of microcapsules and applied ultrasound amplitude 30, 50 and 70%

Адсорбированные белковые молекулы стабилизируют эмульсионную систему за счет электростатического и/или стерического отталкивания, что, в свою очередь, предотвращает агрегацию и коалесценцию капель [3–5, 18]. С другой стороны, полисахариды действуют как стабилизаторы эмульсии в широком диапазоне условий окружающей среды, включая ионную силу, температуру, pH и т.д. Добавление полисахаридов в эмульсию даже регулирует реологию дисперсной фазы, влияя на стабильность эмульсии и свойства пенообразования [37].

Для оценки этих факторов мы исследовали плотность заряда на поверхности частиц путем определения значения дзета-потенциала полученных эмульсий до и после действия ультразвуковой волны. Согласно теории

двойного электрического слоя, дзета-потенциал – это разность потенциалов дисперсионной среды и неподвижного слоя жидкости, окружающего микрочастицу.

Дзета-потенциал границы раздела твердое тело – жидкость является важной величиной, характеризующей поверхность нано- и микрочастиц при разработке биомедицинских полимерных средств и устройств. В данном исследовании применена экспериментальная методика измерения дзета-потенциалов ζ плоских поверхностей с использованием уравнения Смолуховского с измеренным наклоном зависимости тока от времени в электроосмотическом потоке, представленная в работе [31].

$$\zeta = \frac{\mu^* \text{slope} \times L}{\varepsilon_r \times \varepsilon_0 \times E_z^2 \times A_{\text{cross}} (\lambda_{b2} - \lambda_{b1})},$$

где μ – электрофоретическая подвижность эмульсии; E – напряженность электрического поля; L – длина капилляра.

Этот метод является простым и точным по сравнению с традиционными методами проточного потенциала и электрофореза. Очевидно, что измерение полного электрического тока в электроосмотическом потоке проводится относительно просто и легко по сравнению с измерениями в методах электрофореза и потенциала течения.

Дзета-потенциал определяет степень и характер взаимодействия между частицами дисперсной системы. Для частиц, которые относительно малы, высокое значение потенциала означает стабильность, то есть дисперсная система будет устойчива к агрегации и коагуляции. Когда же дзета-потенциал низкий (близок к нулю), притяжение превышает отталкивание и устойчивость дисперсий будет нарушаться.

В табл. 2 представлены результаты определения среднего значения объемного диаметра частиц $d_{4,3}$ и диаметра поверхности $D_{3,2}$, удельной поверхности, дзета-потенциала и вязкости эмульсионных нано- и микрочастиц, найденных в ходе проведенного исследования, в зависимости от приложенной амплитуды ультразвука.

Пектиновые биополимеры могут нести отрицательный заряд на остатках галактуроновой кислоты со свободными карбоксильными группами при C-6 пиранозного цикла, что влияет на их функциональные свойства. Плотность отрицательного заряда пектиновых микромолекул зависит от степени этерификации и pH окружающей дисперсной фазы [38]. Согласно данным работ [18, 39], физико-химические параметры пектина,

Таблица 2. Значения среднего объемного диаметра частиц и диаметра поверхности, удельной поверхности, дзета-потенциала и вязкости эмульсионных нано- и микрочастиц в зависимости от амплитуды ультразвука

Table 2. Average volume diameter of particle and surface diameter, specific surface area, zeta potential and viscosity of emulsion's nano- and microparticles depending on the ultrasound's amplitude

Амплитуда ультразвука, %	Средний объемный диаметр частиц, мкм	Диаметр поверхности, мкм	Удельная поверхность, $\text{см}^2 \times \text{г}^{-1}$	Дзета-потенциал, мВ	Вязкость, $\text{мПа} \times \text{с}$
30	3,48	3,43	19678	-21,3	2,9
50	2,53	2,36	27027	-25,7	2,2
70	2,07	2,01	32967	-29,6	1,8

в частности степень этерификации, и их распределение определяют способность образования комплекса между пектином и белком. Высокая плотность заряда низкометилированных пектинов позволяет формировать комплексы при высокой ионной силе по сравнению с высокометилированными пектинами, имеющими низкую локальную плотность заряда, что было учтено во время добавления электролита при формировании вторичного слоя эмульсионных частиц.

Ввиду вышесказанного можно сделать вывод, что дзета-потенциал пектина на внешней фазе нано- и микрочастиц эмульсии сильно зависит от наличия свободной карбоксильной группы. Из табл. 2 видно, что мощность ультразвука (амплитуда приложенного ультразвука) имеет тенденцию встраивать пектиновые цепи на поверхности частиц эмульсии, которые образуют более отрицательную плотность заряда на поверхности нано- и микрочастиц.

Как видно из данных табл. 2, при 30%-й амплитуде плотность заряда на поверхности частиц составляет -21,3 мВ, при 50%-й амплитуде она равняется -25,7 мВ, при 70%-й амплитуде же она возрастает до -29,6 мВ, что позволяет формировать частицы с наименьшим средним размером (2,07 мкм). Действие ультразвука инициирует образование на поверхности частиц эмульсии пектинового слоя с разной плотностью заряда в зависимости от приложенной силы ультразвука. Найденное оптимальное значение амплитуды ультразвука способствует формированию частиц, имеющих средний размер поверхности $D_{3,2}$ и высокие удельные поверхности (32967 см^2 на 1 мл эмульсии).

Флокуляция была идентифицирована как основное явление дестабилизации в эмульсиях, стабилизированных пектиновыми микромолекулами посредством прилипания низкозарядных частиц, на что указывает и вязкость эмульсии: видно, что чем меньше вязкость, тем больше удельная поверхность и дзета-потенциал.

Показано, что эмульсии, стабилизированные НМЯ, при дополнительной обработке ультразвуком с амплитудой 70% оставались относительно стабильными в течение 14 дней хранения при рабочей температуре 10–20 °С. При этом можно констатировать, что наличие свободных карбоксильных групп в структуре пектина на поверхности белкового депозита и масляных капель приводит к более стабильным эмульсиям с наименьшими размерами частиц.

Таким образом, применение метода ультразвука позволяет стабилизировать эмульсию с получением частиц наименьшего диаметра с мономодальным распределением. Минимальное значение $d_{4,3}$ достигается при 70%-й амплитуде ультразвукового воздействия на эмульсионные микрочастицы. Дальнейшее увеличение амплитуды ультразвука нежелательно с точки зрения энергетических затрат.

Сегодня лекарственных препаратов на основе только эфирных масел лаванды насчитывается более десятка наименований [40, 41]. Этот факт свидетельствует об

актуальности исследований в данном направлении и возможности расширения ассортимента лекарственных средств с эфирными маслами. Широкое распространение устойчивости к антибиотикам среди патогенных и условно-патогенных микроорганизмов делает актуальным изучение антимикробных свойств препаратов природного происхождения. Биоактивные соединения, в том числе и эфирные масла лекарственных растений, могут быть эффективным дополнением в комплексной терапии многих инфекционных заболеваний.

Согласно отчету Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) о лекарственной устойчивости за 2022 год¹, наиболее серьезную озабоченность порождает резистентность микробных штаммов *Klebsiella pneumoniae* к цефалоспорином третьего поколения и карбапенемам, *Escherichia coli* – к цефалоспорином третьего поколения и фторхинолонам, *Staphylococcus aureus* – к метициллину, *Streptococcus pneumoniae* – к пенициллину, *Salmonella sp.* – к фторхинолонам. Среди грибковых инфекций наиболее распространенной проблемой является кандидоз, вызываемый в основном *Candida albicans* и реже *C. glabrata* и *C. parapsilosis*, причем более 20 видов *Candida* могут являться причиной инфицирования человека. Как отмечается в новом отчете ВОЗ², в мире пока еще не разработаны крайне эффективные антибактериальные препараты, действие которых было бы достаточным в условиях растущего осознания серьезной и непосредственной угрозы антибиотикорезистентности. По данным ВОЗ, ни один из 43 антибиотиков, находящихся в настоящее время на стадии клинической разработки, не решает в достаточной степени проблему устойчивости самых опасных в мире бактерий к лекарственным средствам. В этом плане увеличение дозы антибиотиков нежелательно, так как оно отрицательно влияет на микрофлору кишечника и приводит к дисбактериозу. В то же время использование более безвредных антимикробных средств растительного происхождения может решить данную задачу.

Эфирное масло лаванды также является противомикробным средством, однако его использование в пищевых продуктах ограничено вследствие плохой растворимости в воде и высокой летучести. Например, китайские ученые включили эфирное масло лаванды в микропоры циклодекстрина. За счет применения носителя циклодекстрина антимикробная активность эфирного масла лаванды возросла в три раза [42].

В данной работе нами были изучены бактерицидные свойства эфирного масла лаванды и инкапсулированного эфирного масла лаванды в эмульсионных нано- и микрокапсулах (LgC/НМЯ-ЭМЛ). Систему доставки LgC/НМЯ-ЭМЛ испытывали на пяти микробных представителях: *Staphylococcus Epidermidis*, *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* и дрожжевые грибы. Бактерицидные свойства изучали путем измерения зоны задержки роста микробов в 1 мм при внесении препарата в среду соответствующих штаммов. Наличие

¹ Эпиднадзор за устойчивостью к противомикробным препаратам в Европе, данные 2022 г. // Всемирная организация здравоохранения. Режим доступа: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376900/9789289060844-rus.pdf?sequence=1> (дата обращения: 29.11.2023).

² World Health Organization. Global database for the tripartite antimicrobial resistance country self-assessment survey. Geneva: WHO, 2024. Available at: <https://amrcountryprogress.org/> (дата обращения 03.12.2024).

роста вокруг препарата говорит об устойчивости данного микроба к препарату (табл. 3).

Таблица 3. Бактерицидные действия эфирного масла лаванды и эмульсионных микрокапсул лаванды системе концентрат лактоглобулина / яблочный пектин на микробные штаммы и дрожжевые грибы

Table 3. Bactericidal effects of lavender essential oil and emulsion microcapsules of lactoglobulins concentrate / apple pectin on microbial strains and yeast fungi

Наименование препарата	Зона задержки роста микробов, мм				
	<i>Staphylococcus Epidermidis</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i>	Дрожжевые грибы
ЭМЛ-Н ₂ O	6	0	2	7	5
LgC/НМЯ-ЭМЛ (1:50)	11	7	10	13	16

Как видно из представленных в табл. 3 данных, эфирное масло лаванды узколистной в чистом виде слабо или вообще не оказывает бактерицидных свойств на представителей *Staph. Aureus* и слабо действует на *Klebsiella*, *Staph. Epidermidis* и штаммы дрожжевых грибов. В то же время капсулированное эфирное масло в виде нано- и микроэмульсий оказалось чувствительным ко всем видам изученных бактерий. Согласно данным табл. 3, препарат LgC/НМЯ-ЭМЛ при разбавлении (1:50) оказывает бактерицидные свойства на *Klebsiella*, *Staph. Epidermidis*. Штаммы дрожжевых грибов также оказались чувствительными к эмульсионным микрокапсулам эфирного масла лаванды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из анализа обзора научных работ становится очевидным, что внимание исследователей нацелено на разработку коллоидных систем доставки для инкапсулирования фитохимических веществ с целью улучшения их диспергируемости в воде, химической стабильности, профиля высвобождения и биологической эффективности. Для использования в качестве фитохимических

пероральных систем доставки доступен широкий спектр различных видов систем, включая мицеллы, эмульсии, твердые липидные наночастицы, липосомы и биополимерные микрогели. Успешная доставка биоактивных фитохимических веществ пероральным путем сопряжена с рядом препятствий. Каждая из этих систем доставки имеет свои преимущества и недостатки для конкретного применения. Следовательно, производитель должен определить и оптимизировать наиболее подходящую коллоидную систему доставки фитохимических соединений для коммерческого продукта.

В данной работе нами изучено влияние амплитуды ультразвука на стабильность нано- и микрокапсул, размера частиц и их распределения в объеме эмульсии. Вычислены средний размер полученных микрокапсул, дзета-потенциал, удельная поверхность частиц и вязкость дисперсной системы. Показано, что действие ультразвука инициирует образование пектинового слоя с разной плотностью заряда на поверхности частиц эмульсии в зависимости от приложенной силы ультразвука. Найдено оптимальное значение амплитуды ультразвука, способствующее формированию частиц со средним размером и с высокой удельной поверхностью 32967 см² на 1 мл эмульсии. Полученные нано- и микрочастицы с эфирным маслом показали хорошую антимикробную и антигрибковую активности.

Состав, размер, заряд и характеристики загрузки коллоидных частиц должны быть выбраны таким образом, чтобы они были совместимы со средой матрицы конечного продукта – pH, ионной силой, взаимодействием ингредиентов, механическими нагрузками и термической стабильностью.

В рассмотренном плане разработанные нами системы доставки на основе пищевых биополимеров с выявленными характеристиками вполне могут соответствовать этим требованиям и найти применение в области создания функциональных продуктов для профилактических целей. Для внедрения этих систем в первую очередь важно установить количество и дозу биоактивных соединений, которые необходимы для желаемого эффекта, а также их безопасные и нетоксичные дозы с помощью исследований *in vitro* и *in vivo*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Cicero A.F.G., Colletti A. Role of phytochemicals in the management of metabolic syndrome // *Phytomedicine*. 2016. Vol. 23, no. 11. P. 1134–1144. DOI: 10.1016/j.phymed.2015.11.009.
2. Banwo K., Olojede A.O., Adesulu-Dahunsi A.T., Verma D.K., Thakur M., Tripathy S., et al. Functional importance of bioactive compounds of foods with Potential Health Benefits: a review on recent trends // *Food Bioscience*. 2021. Vol. 43. P. 101320. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101320.
3. McClements D.J. Advances in nanoparticle and micro-particle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals // *Biotechnology Advances*. 2020. Vol. 38. P. 107287. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.08.004.
4. Araiza-Calahorra A., Akhtar M., Sarkar A. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: from encapsulation to bioaccessibility // *Trends in Food Science & Technology*. 2018. Vol. 71. P. 155–169. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.11.009.
5. Lagoa R., Silva J., Rodrigues J.R., Bishayee A. Advances in phytochemical delivery systems for improved anticancer activity // *Biotechnology Advances*. 2020. Vol. 38. P. 107382. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.04.004.
6. Kaur V., Kumar M., Kumar A., Kaur K., Dhillion V., Kaur S. Pharmacotherapeutic potential of phytochemicals: implications in cancer chemo-prevention and future perspectives // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018. Vol. 97. P. 564–586. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.124.
7. Barba F.J., Mariutti L.R.B., Bragagnolo N., Mercadante A.Z., Barbosa-Cánovas G.V., Orlén V. Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing // *Trends in Food Science & Technology*. 2017. Vol. 67. P. 195–206. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.07.006.
8. Gleeson J.P. Diet, food components and the intes-

tinal barrier // Nutrition Bulletin. 2017. Vol. 42, no. 2. P. 123–131. DOI: 10.1111/nbu.12260.

9. Zhang R., Belwal T., Li L., Lin X., Xu Y., Luo Z. Recent advances in polysaccharides stabilized emulsions for encapsulation and delivery of bioactive food ingredients: a review // Carbohydrate Polymers. 2020. Vol. 242. P. 116388. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116388.

10. Anal A.K., Shrestha S., Sadiq M.B. Biopolymeric-based emulsions and their effects during processing, digestibility and bioaccessibility of bioactive compounds in food systems // Food Hydrocolloids. 2019. Vol. 87. P. 691–702. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.09.008.

11. Nanobiotechnology. Human health and the environment / eds A. Dhawan, S. Singh, A. Kumar, R. Shanker. Boca Raton: CRC Press, 2018. 512 p. DOI: 10.1201/9781351031585.

12. Silva M.P., Fabi J.P. Food biopolymers-derived nanogels for encapsulation and delivery of biologically active compounds: a perspective review // Food Hydrocolloids for Health. 2022. Vol. 2. P. 100079. DOI: 10.1016/j.fhfh.2022.100079.

13. Wei Z., Huang Q. Assembly of protein – polysaccharide complexes for delivery of bioactive ingredients: a perspective paper // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2019. Vol. 67, no. 5. P. 1344–1352. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b06063.

14. Anal K., Boonlao N., Ruktanonchai U.R. Emulsion systems stabilized with biopolymers to enhance oral bioaccessibility and bioavailability of lipophilic bioactive compounds // Current Opinion in Food Science. 2023. Vol. 50. P. 101001. DOI: 10.1016/j.cofs.2023.101001.

15. Semenova M. Protein – polysaccharide associative interactions in the design of tailor-made colloidal particles // Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2017. Vol. 28. P. 15–21. DOI: 10.1016/j.cocis.2016.12.003.

16. Rezaei A., Fathi M., Jafari S.M. Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers // Food Hydrocolloids. 2019. Vol. 88. P. 146–162. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.10.003.

17. Koksel H., Masatcioglu T., Kahraman K., Ozturk S., Basman A. Improving effect of lyophilization on functional properties of resistant starch preparations formed by acid hydrolysis and heat treatment // Journal of Cereal Science. 2008. Vol. 47, no. 2. P. 275–282. DOI: 10.1016/j.jcs.2007.04.007.

18. Мухидинов З.К., Бобокалонов Д.Т., Усманова С.Р. Пектин – основа для создания функциональной пищи. Душанбе: Изд-во ООО «СифатОфсет», 2019. 192 с.

19. Rezzoug M., Bakchiche B., Gherib A., Roberta A., Flamini Guido, Kilincarslan Ö., et al. Chemical composition and bioactivity of essential oils and ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* L. and *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. from the Algerian Saharan Atlas // BMC Complementary and Alternative Medicine. 2019. Vol. 19. P. 146. DOI: 10.1186/s12906-019-2556-y.

20. Sharopov F., Setzer W.N. Medicinal plants of Tajikistan // Vegetation of Central Asia and environs / eds D. Egamberdieva, M. Öztürk. Cham: Springer, 2018. P. 163–209. DOI: 10.1007/978-3-319-99728-5_7.

21. Yamani H.A., Pang E.C., Mantri N., Deighton M.A. Antimicrobial activity of Tulsi (*Ocimum tenuiflorum*) essential oil and their major constituents against three species of bacteria // Frontiers in Microbiology. 2016. Vol. 7. P. 681. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00681.

22. Rai M., Paralikar P., Jogee P., Agarkar G., Ingle A. P., Derita M., et al. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: emerging trends and future perspectives // International Journal of Pharmaceutics. 2017. Vol. 519, no. 1-2. P. 67–78. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.01.013.

23. Sokmen A., Abdel-Baki A.-A.S., Al-Malki E.S., Al-Quraishy S., Abdel-Haleem H.M. Constituents of essential oil of *Origanum minutiflorum* and its in vitro antioxidant, scolicidal and anticancer activities // Journal of King Saud University – Science. 2020. Vol. 32, no. 4. P. 2377–2382. DOI: 10.1016/j.jksus.2020.03.018.

24. Yang K., Liu A., Hu A., Li J., Zen Z., Liu Y., et al. Preparation and characterization of cinnamon essential oil nanocapsules and comparison of volatile components and antibacterial ability of cinnamon essential oil before and after encapsulation // Food Control. 2021. Vol. 123. P. 107783. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107783.

25. Elsebai M.F., Albalawi M.A. Essential oils and COVID-19 // Molecules. 2022. Vol. 27, no. 22. P. 7893. DOI: 10.3390/molecules27227893.

26. Strub D.J., Talma M., Strub M., Rut W., Zmudzinski M., Brud W., et al. Evaluation of the anti-SARS-CoV-2 properties of essential oils and aromatic extracts // Scientific Reports. 2022. Vol. 12. P. 14230. DOI: 10.1038/s41598-022-18676-w.

27. Патент № 563, Республика Таджикистан. Флеш способ экстракции пектина из растительного сырья / З.К. Мухидинов, Х.И. Тешаев, А.С. Джонмуродов, Л.С. Лиу. Оpubл. 2013. Бюл. № 86.

28. Мухидинов З.К., Джонмуродов А.С., Тешаев Х.И., Бобокалонов Д.Т., Халикова М.Д., Касымова Г.Ф. [и др.]. Концентрат лактоглобулинов из молочной сыворотки и методы их выделения // Журнал здравоохранения Таджикистана. 2009. N 5. С. 44–49.

29. Shamsara O., Jafari S.M., Muhidionv Z.K. Development of double layered emulsion droplets with pectin/ β -lactoglobulin complex for bioactive delivery purposes // Journal of Molecular Liquid. 2017. Vol. 243. P. 144–150. DOI: 10.1016/j.molliq.2017.08.036.

30. Kharat M., Zhang G., McClements D.J. Stability of curcumin in oil-in-water emulsions: impact of emulsifier type and concentration on chemical degradation // Food Research International. 2018. Vol. 111. P. 178–186. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.05.021.

31. Sze A., Erickson D., Ren L., Li D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow // Journal of Colloid and Interface Science. 2003. Vol. 261, no. 2. P. 402–410. DOI: 10.1016/S0021-9797(03)00142-5.

32. Sumalan R.M., Kuganov R., Obistioiu D., Popescu I., Radulov I., Alexa E., et al. Assessment of mint, basil and lavender essential oils vapor-phase in antifungal protection and lemon fruits quality // Molecules. 2020. Vol. 25, no. 8, P. 1831. DOI: 10.3390/molecules25081831.

33. Rashad Y.M., Abdel Razik E.S., Darwish D.B. Essential oil from *Lavandula angustifolia* elicits expression of three SbWRKY transcription factors and defense-related genes against sorghum damping-off // Scientific Reports. 2022. Vol. 12. P. 857. DOI: 10.1038/s41598-022-04903-x.

34. Wang R., Wang L.-H., Wen Q.-H., He F., Xu F.-Y., Chen B.-R., et al. Combination of pulsed electric field and pH shifting improves the solubility, emulsifying, foaming of

commercial soy protein isolate // *Food Hydrocolloids*. 2023. Vol. 134. P. 108049. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2022.108049.

35. O'Sullivan J., Murray B., Flynn C., Norton I. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins // *Food Hydrocolloids*. 2016. Vol. 53. P. 141–154. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.02.009.

36. Shamsara O., Muhidinov Z.K., Jafari S.M., Bobokalonov J., Jonmurodov A., Taghvaei M., et al. Effect of ultrasonication, pH and heating on stability of apricot gum-lactoglobuline two-layer nanoemulsions // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015. Vol. 81. P. 1019–1025. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.056.

37. Tippetts M., Shen F.K., Martini S. Oil globule microstructure of protein/polysaccharide or protein/protein bilayer emulsions at various pH // *Food Hydrocolloids*. 2013. Vol. 30, no. 2. P. 559–566. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.07.012.

38. Neckebroek B., Verkempinck S.H.E., Vaes G., Wouters K., Magnée J., Hendrickx M.E., et al. Advanced insight into the emulsifying and emulsion stabilizing capacity

of carrot pectin subdomains // *Food Hydrocolloids*. 2020. Vol. 102. P. 105594. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.105594.

39. Devi N., Sharmah M., Khatun B., Maji T.K. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide – protein complex coacervates // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017. Vol. 239. P. 136–145. DOI: 10.1016/j.cis.2016.05.009.

40. Пономарева Е.И., Молохова Е.И., Холов А.К. Применение эфирных масел в фармации // *Современные проблемы науки и образования*. 2015. N 4. С. 567. EDN: UDXCBP.

41. Червоткина Д.Р., Борисова А.В. Антимикробные препараты природного происхождения: обзор свойств и перспективы применения // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2022. Т. 12. N 2. 254–267. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-2-254-267. EDN: EKZZBE.

42. Yuan C., Wang Y., Liu Y., Cui B. Physicochemical characterization and antibacterial activity assessment of lavender essential oil encapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin // *Industrial Crops and Products*. 2019. Vol. 130. P. 104–110. DOI: 10.1016/J.INDCROP.2018.12.067.

REFERENCES

1. Cicero A.F.G., Colletti A. Role of phytochemicals in the management of metabolic syndrome. *Phytomedicine*. 2016;23(11):1134-1144. DOI: 10.1016/j.phymed.2015.11.009.

2. Banwo K., Olojede A.O., Adesulu-Dahunsi A.T., Verma D.K., Thakur M., Tripathy S., et al. Functional importance of bioactive compounds of foods with Potential Health Benefits: a review on recent trends. *Food Bioscience*. 2021;43:101320. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101320.

3. McClements D.J. Advances in nanoparticle and microparticle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals. *Biotechnology Advances*. 2020;38:107287. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.08.004.

4. Araiza-Calahorra A., Akhtar M., Sarkar A. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: from encapsulation to bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology*. 2018;71:155-169. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.11.009.

5. Lagoa R., Silva J., Rodrigues J.R., Bishayee A. Advances in phytochemical delivery systems for improved anticancer activity. *Biotechnology Advances*. 2020;38:107382. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.04.004.

6. Kaur V., Kumar M., Kumar A., Kaur K., Dhillon V., Kaur S. Pharmacotherapeutic potential of phytochemicals: implications in cancer chemo-prevention and future perspectives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;97:564-586. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.124.

7. Barba F.J., Mariutti L.R.B., Bragagnolo N., Mercadante A.Z., Barbosa-Cánovas G.V., Orlén V. Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. *Trends in Food Science & Technology*. 2017;67:195-206. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.07.006.

8. Gleeson J.P. Diet, food components and the intestinal barrier. *Nutrition Bulletin*. 2017;42(2):123-131. DOI: 10.1111/mbu.12260.

9. Zhang R., Belwal T., Li L., Lin X., Xu Y., Luo Z. Recent advances in polysaccharides stabilized emulsions for encapsulation and delivery of bioactive food ingredients: a review. *Carbohydrate Polymers*. 2020;242:116388. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116388.

10. Anal A.K., Shrestha S., Sadiq M.B. Biopolymeric-based emulsions and their effects during processing, digestibility and bioaccessibility of bioactive compounds in food systems. *Food Hydrocolloids*. 2019. Vol. 87. P. 691–702. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.09.008.

11. Dhawan A., Singh S., Kumar A., Shanker R. Nano-biotechnology. Human health and the environment. Boca Raton: CRC Press; 2018, 512 p. DOI: 10.1201/9781351031585.

12. Silva M.P., Fabi J.P. Food biopolymers-derived nanogels for encapsulation and delivery of biologically active compounds: a perspective review. *Food Hydrocolloids for Health*. 2022;2:100079. DOI: 10.1016/j.fhfh.2022.100079.

13. Wei Z., Huang Q. Assembly of protein – polysaccharide complexes for delivery of bioactive ingredients: a perspective paper. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019;67(5):1344-1352. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b06063.

14. Anal K., Boonlao N., Ruktanonchai U.R. Emulsion systems stabilized with biopolymers to enhance oral bioaccessibility and bioavailability of lipophilic bioactive compounds. *Current Opinion in Food Science*. 2023;50:101001. DOI: 10.1016/j.cofs.2023.101001.

15. Semenova M. Protein – polysaccharide associative interactions in the design of tailor-made colloidal particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2017;28:15–21. DOI: 10.1016/j.cocis.2016.12.003.

16. Rezaei A., Fathi M., Jafari S.M. Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. *Food Hydrocolloids*. 2019;88:146-162. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.10.003.

17. Koksel H., Masatcioglu T., Kahraman K., Ozturk S., Basman A. Improving effect of lyophilization on functional properties of resistant starch preparations formed by acid hydrolysis and heat treatment. *Journal of Cereal Science*. 2008;47(2):275-282. DOI: 10.1016/j.jcs.2007.04.007.

18. Muhidinov Z.K., Bobokalonov J.T., Usmanova S.R. *Pectin is the basis for creating functional foods*. Dushanbe: SifatOffset; 2019, 192 p. (In Russian).

19. Rezzoug M., Bakchiche B., Gherib A., Roberta A., Flamini Guido, Kilincarslan Ö., et al. Chemical composition and bioactivity of essential oils and ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* L. and *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut.

from the Algerian Saharan Atlas. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2019;19:146. DOI: 10.1186/s12906-019-2556-y.

20. Sharopov F., Setzer W.N. Medicinal plants of Tajikistan. In: Egamberdieva D., Öztürk M. (eds). *Vegetation of Central Asia and environs*. Cham: Springer; 2018, p. 163-209. DOI: 10.1007/978-3-319-99728-5_7.

21. Yamani H.A., Pang E.C., Mantri N., Deighton M.A. Antimicrobial activity of Tulsi (*Ocimum tenuiflorum*) essential oil and their major constituents against three species of bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:681. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00681.

22. Rai M., Paralikar P., Jogee P., Agarkar G., Ingle A.P., Derita M., et al. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: emerging trends and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;519(1-2):67-78. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.01.013.

23. Sokmen A., Abdel-Baki A.-A.S., Al-Malki E.S., Al-Quraishi S., Abdel-Haleem H.M. Constituents of essential oil of *Origanum minutiflorum* and its in vitro antioxidant, scolicidal and anticancer activities. *Journal of King Saud University – Science*. 2020;32(4):2377-2382. DOI: 10.1016/j.jksus.2020.03.018.

24. Yang K., Liu A., Hu A., Li J., Zen Z., Liu Y., et al. Preparation and characterization of cinnamon essential oil nanocapsules and comparison of volatile components and antibacterial ability of cinnamon essential oil before and after encapsulation. *Food Control*. 2021;123:107783. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107783.

25. Elsebai M.F., Albalawi M.A. Essential oils and COVID-19. *Molecules*. 2022;27(22):7893. DOI: 10.3390/molecules27227893.

26. Strub D.J., Talma M., Strub M., Rut W., Zmudzinski M., Brud W., et al. Evaluation of the anti-SARS-CoV-2 properties of essential oils and aromatic extracts. *Scientific Reports*. 2022;12:14230. DOI: 10.1038/s41598-022-18676-w.

27. Mukhidinov Z.K., Teshaev Kh.I., Dzhonmurodov A.S., Liu L.S. *Flash method for extracting pectin from plant materials*. Patent RT, no. 563; 2013. (In Russian).

28. Muhidinov Z.K., Jonmurodov A.S., Teshaev Kh.I., Bobokalonov D.T., Khalikova M.D., Kasymova G.F., et al. Concentrate of lactoglobulins from whey and methods for their isolation. *Zhurnal zdavookhraneniya Tadzhikistana*. 2009;5:44-49. (In Russian).

29. Shamsara O., Jafari S.M., Muhidinov Z.K. Development of double layered emulsion droplets with pectin/ β -lactoglobulin complex for bioactive delivery purposes. *Journal of Molecular Liquid*. 2017;243:144-150. DOI: 10.1016/j.molliq.2017.08.036.

30. Kharat M., Zhang G., McClements D.J. Stability of curcumin in oil-in-water emulsions: impact of emulsifier type and concentration on chemical degradation. *Food Research International*. 2018;111:178-186. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.05.021.

31. Sze A., Erickson D., Ren L., Li D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow.

Journal of Colloid and Interface Science. 2003;261(2):402-410. DOI: 10.1016/S0021-9797(03)00142-5.

32. Sumalan R.M., Kuganov R., Obistoiu D., Popescu I., Radulov I., Alexa E., et al. Assessment of mint, basil and lavender essential oils vapor-phase in antifungal protection and lemon fruits quality. *Molecules*. 2020;25(8):1831. DOI: 10.3390/molecules25081831.

33. Rashad Y.M., Abdel Razik E.S., Darwish D.B. Essential oil from *Lavandula angustifolia* elicits expression of three SbWRKY transcription factors and defense-related genes against sorghum damping-off. *Scientific Reports*. 2022;12:857. DOI: 10.1038/s41598-022-04903-x.

34. Wang R., Wang L.-H., Wen Q.-H., He F., Xu F.-Y., Chen B.-R., et al. Combination of pulsed electric field and pH shifting improves the solubility, emulsifying, foaming of commercial soy protein isolate. *Food Hydrocolloids*. 2023;134:108049. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2022.108049.

35. O'Sullivan J., Murray B., Flynn C., Norton I. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocolloids*. 2016;53:141-154. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.02.009.

36. Shamsara O., Muhidinov Z.K., Jafari S.M., Bobokalonov J., Jonmurodov A., Taghvaei M., et al. Effect of ultrasonication, pH and heating on stability of apricot gum-lactoglobuline two-layer nanoemulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015;81:1019-1025. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.056.

37. Tippetts M., Shen F.K., Martini S. Oil globule microstructure of protein/polysaccharide or protein/protein bilayer emulsions at various pH. *Food Hydrocolloids*. 2013;30(2):559-566. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.07.012.

38. Neckebroek B., Verkempinck S.H.E., Vaes G., Wouters K., Magnée J., Hendrickx M.E., et al. Advanced insight into the emulsifying and emulsion stabilizing capacity of carrot pectin subdomains. *Food Hydrocolloids*. 2020;102:105594. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.105594.

39. Devi N., Sharmah M., Khatun B., Maji T.K. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide – protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017;239:136-145. DOI: 10.1016/j.cis.2016.05.009.

40. Ponomareva E.I., Molokhova E.I., Kholov A.K. The usage of essential oils in pharmacy. *Modern problems of science and education*. 2015;4:567. (In Russian). EDN: UDXCBP.

41. Chervotkina D.R., Borisova A.V. Antimicrobial substances of natural origin: a review of properties and prospects. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(2):254-267. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-2-254-267. EDN: EKZZBE.

42. Yuan C., Wang Y., Liu Y., Cui B. Physicochemical characterization and antibacterial activity assessment of lavender essential oil encapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Industrial Crops and Products*. 2019;130:104-110. DOI: 10.1016/J.INDCROP.2018.12.067.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Алиева Шахнозобону Раджабековна,
аспирант,
Институт химии им. В.И. Никитина
Национальной академии наук Таджикистана,
734065, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2,
Республика Таджикистан,
химик-аналитик,
Научно-исследовательский центр экологии
и окружающей среды Центральной Азии,
734025, г. Душанбе, ул. Айни, 267,
Республика Таджикистан,
sh_bonu_95@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-2778-0834>

Кодирова Гулру Абдусаматовна,
научный сотрудник,
Институт химии им. В.И. Никитина
Национальной академии наук Таджикистана,
734065, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2,
Республика Таджикистан,
gulruqodirova525@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0009-2222-2329>

Шерова Замира Умаралиевна,
научный сотрудник,
Институт химии им. В.И. Никитина
Национальной академии наук Таджикистана,
734065, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2,
Республика Таджикистан,
sh.zamira_95@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0387-6297>

Усманова Сураё Рахматжоновна,
к.х.н., ведущий научный сотрудник,
Институт химии им. В.И. Никитина
Национальной академии наук Таджикистана,
734065, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2,
Республика Таджикистан,
surayo.usmanova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4254-7699>

Муҳидинов Зайниддин Камарович,
д.х.н., профессор, главный научный сотрудник,
Институт химии им. В.И. Никитина
Национальной академии наук Таджикистана,
734065, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2,
Республика Таджикистан,
✉ zainy@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0023-2229>

Вклад авторов

Ш.Р. Алиева – проведение экспериментов,
обработка данных.
Г.А. Кодирова – проведение экспериментов.
З. У. Шерова – получение и обработка данных.
Усманова С. Р. – научное руководство,
редактирование текста статьи.
З. К. Муҳидинов – научное руководство,
разработка концепции исследования,
развитие методологии, формулирование
итоговых выводов, написание текста статьи.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Shakhnozabonu R. Alieva,
Postgraduate Student,
Institute of Chemistry named after V.I. Nikitin,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Aini St., Dushanbe, 734063,
Republic of Tajikistan,
Chemist,
Research Center for Ecology
and Environment of Central Asia,
267, Aini St., Dushanbe, 734025,
Republic of Tajikistan,
sh_bonu_95@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-2778-0834>

Gulru A. Qodirova,
Researcher,
Institute of Chemistry named after V.I. Nikitin,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Aini St., Dushanbe, 734063,
Republic of Tajikistan,
gulruqodirova525@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0009-2222-2329>

Zamira U. Sherova,
Researcher,
Institute of Chemistry named after V.I. Nikitin,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Aini St., Dushanbe, 734063,
Republic of Tajikistan,
sh.zamira_95@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0387-6297>

Surayo R. Usmanova,
Cand. Sci. (Chemistry), Leading Researcher,
Institute of Chemistry named after V.I. Nikitin,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Aini St., Dushanbe, 734063,
Republic of Tajikistan,
surayo.usmanova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4254-7699>

Zayniddin K. Muhidinov,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Chief Researcher,
Institute of Chemistry named after V.I. Nikitin,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Aini St., Dushanbe, 734063,
Republic of Tajikistan,
✉ zainy@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0023-2229>

Contribution of the authors

Shakhnozabonu R. Alieva – conducting
experiments, data processing.
Gulru A. Qodirova – conducting experiments.
Zamira U. Sherova – data processing.
Surayo R. Usmanova – supervision,
editing the text of manuscript.
Zayniddin K. Muhidinov – scientific leadership,
research concept and methodology development,
supervision, writing the text of manuscript,
final conclusions.

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 01.12.2023.
Одобрена после рецензирования 09.09.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

Information about the article

The article was submitted 01.12.2023.
Approved after reviewing 09.09.2024.
Accepted for publication 30.11.2024.

Научная статья
УДК 581.1:577.214.625:578.853
EDN: VEHRVM
DOI: 10.21285/achb.945



Рост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtrXTH1* в условиях абиотического стресса

З.А. Бережнева, Х.Г. Мусин, Б.Р. Кулуев✉

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН,
Уфа, Россия

Аннотация. Ксилоглюканэндотрансгликозилазы представляют собой гидролитические ферменты клеточных стенок, которые участвуют в регуляции и обеспечении роста растений. Сверхэкспрессия генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз может позитивно влиять на рост и стрессоустойчивость трансгенных растений, однако механизмы такого влияния остаются малоизученными. Целью данной работы являлось создание трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы осины *PtrXTH1*, а также морфофизиологический анализ их корней в условиях действия абиотических стресс-факторов. Трансгенные растения табака характеризовались увеличенной длиной корней по сравнению с растениями дикого типа как при оптимальных условиях, так и при засолении (действие хлорида натрия в концентрации 100 мМ), гипотермии (12 °С) и загрязнении кадмием (действие ацетата кадмия в концентрации 200 мкМ). Площадь клеток паренхимы корней у трансгенных растений табака была больше по сравнению с растениями дикого типа только при действии ацетата кадмия, тогда как при норме, гипотермии и засолении разница в размере клеток не обнаруживалась. Сверхэкспрессия гена *PtrXTH1* способствовала увеличению в корнях общей антиоксидантной способности, содержания пролина, водорастворимых сахаров, окисленного и восстановленного глутатиона при действии всех трех стрессовых факторов. Таким образом, трансген *PtrXTH1* оказывает стимулирующее действие на рост корней табака при норме и действии абиотических стресс-факторов, что сопровождается положительными изменениями в антиоксидантной системе.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, антиоксидантная система, гипотермия, засоление, кадмий, рост корней, трансгенные растения

Финансирование. Исследование выполнено в рамках госзадания 122030200143-8.

Для цитирования: Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Рост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtrXTH1* в условиях абиотического стресса // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 495–503. DOI: 10.21285/achb.945. EDN: VEHRVM.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Root growth in transgenic tobacco plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene encoding xyloglucan endotransglycosylase under abiotic stress

Zoya A. Berezhneva, Khalit G. Musin, Bulat R. Kuluev✉

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center RAS, Ufa, Russian Federation

Abstract. Xyloglucan endotransglycosylases are hydrolytic cell wall enzymes that are involved in the regulation and promotion of plant growth. Overexpression of genes encoding xyloglucan endotransglycosylases can have a positive

© Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р., 2024

effect on the growth and stress tolerance of transgenic plants; however, the mechanisms of such influence remain poorly understood. This study was aimed at creating transgenic tobacco plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene encoding aspen xyloglucan endotransglycosylase, as well as conducting a morphophysiological analysis of their roots under abiotic stress. The transgenic tobacco plants were characterized by an increased root length as compared to wild plants, both under optimal conditions and in response to salinity (100 mM sodium chloride), low temperature (12 °C), and cadmium contamination (200 µM cadmium acetate). The area of root parenchyma cells in transgenic tobacco plants is larger as compared to wild plants only under the effect of cadmium acetate, whereas under normal conditions and under low-temperature and salinity stress, no difference in cell size was observed. The *PtrXTH1* gene overexpression contributed to the increased total antioxidant capacity in the roots, as well as a higher content of proline, water-soluble sugars, and oxidized and reduced glutathione, in the context of the three stress factors. Thus, the *PtrXTH1* transgene stimulates the growth of tobacco roots under normal and abiotic stress conditions, which is accompanied by positive changes in the antioxidant system.

Keywords: *Nicotiana tabacum*, antioxidant system, low temperature, salinity, cadmium, root growth, transgenic plants

Funding. This study was supported by state assignment 122030200143-8.

For citation: Berezhneva Z.A., Musin K.G., Kuluev B.R. Root growth in transgenic tobacco plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene encoding xyloglucan endotransglycosylase under abiotic stress. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):495-503. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.945. EDN: VEHRVM.

ВВЕДЕНИЕ

Ксилоглюканэндотрансгликозилазы представляют собой апопластические гидролитические ферменты, которые осуществляют реакции трансгликозилирования и расщепления связующих гликанов, способствуя разрушению клеточной стенки, что необходимо для роста клеток [1]. Гены ксилоглюканэндотрансгликозилаз играют важную роль в обеспечении роста растений при воздействии абиотических стресс-факторов. К примеру, конститутивная экспрессия гена *CaXTH3 Capsicum annuum* в трансгенных растениях *Arabidopsis thaliana* повышала их устойчивость к засухе и засолению [2]. При воздействии гипотермии происходило понижение уровня экспрессии гена *DkXTH6* и повышение уровня транскриптов гена *DkXTH7* хурмы в *A. thaliana* [3]. Сверхэкспрессия гена *DkXTH1* хурмы в трансгенных растениях *A. thaliana* повышала их толерантность к засолению, засухе и воздействию абсцизовой кислоты, а также позитивно влияла на рост корней и листьев [4]. Уровень транскриптов гена *NtEXGT* табака увеличивался в условиях засоления, засухи и низких положительных температур, а трансгенные растения *35S::NtEXGT* имели увеличенные размеры органов при воздействии абиотических стресс-факторов [5]. Трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *PnXTH1* характеризовались увеличенными размерами органов побега при воздействии засоления по сравнению с растениями дикого типа [6]. Сверхэкспрессия гена *PeXTH Populus euphratica* в трансгенных растениях табака повышала солеустойчивость [7]. Экспрессия генов *AtXTH19* и *AtXTH23* в растениях *A. thaliana* повышалась под действием солевого стресса. Некоторые гены ксилоглюканэндотрансгликозилазы китайской капусты (*Brassica rapa* L.) активировались при тепловом стрессе [8], а ген *OsXET9* риса индуцировался при холодном стрессе [9]. Дифференциальная экспрессия генов *NtXTHs* табака наблюдалась при различных стрессовых условиях, и экспрессия почти всех *NtXTHs* была повышена при действии различных стрессовых факторов, таких как засоление, защелачивание, засуха и гипотермия [10].

Таким образом, гены ксилоглюканэндотрансгликозилаз могут быть использованы в генной инженерии для увеличения устойчивости растений к абиотическим

стресс-факторам, однако механизмы позитивного влияния ксилоглюканэндотрансгликозилаз на стрессоустойчивость остаются малоизученными. Более того, большинство исследований конститутивной экспрессии генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз проведено на органах побега [6–8], а о роли этих ферментов при росте корней в стрессовых условиях сведений пока немного. Исходя из этого, целью данного исследования было получение трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* осины, проведение морфометрического и микроскопического анализа, а также оценка состояния антиоксидантной системы корней этих растений в условиях абиотических стрессов, таких как засоление, гипотермия и воздействие кадмия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение, отбор и анализ трансгенных растений. Для генетической трансформации табака использовали конструкцию гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtrXTH1* осины (*Populus tremula* L.) в бинарном векторе pCambia1301 с 35S CaMV промотором, которую получали, как описано ранее [6]. Для клонирования и анализа методом полимеразной цепной реакции бактериальных клонов и трансгенных растений использовали праймеры, подобранные ранее к ортологичному гену *PtXTH1 Populus trichocarpa* (XM_006385804) [6]. Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков. Отбор трансгенных растений проводили по результатам анализа методом полимеразной цепной реакции на наличие гена *PtrXTH1*, гистохимического анализа на активность β-глюкуронидазы и анализа устойчивости к селективному антибиотику гиромоцину. Подробности получения, отбора и анализа трансгенных растений табака описаны нами ранее [6]. Морфометрический анализ проводился на трансгенных растениях второго поколения (T₂), выращенных на селективной среде Мурасиге – Скуга (МС) с добавлением антибиотика гиромоцина для элиминации нетрансгенных сеянцев. Тотальную РНК из корней исследуемых растений табака выделяли методом тризол-хлороформной экстракции, первую цепь кДНК строили при помощи олиго(dT) праймера и MMuLV-

ревертазы (NEB, США). Количественное определение содержания мРНК (после конверсии в кДНК) гена *PtrXTH1* проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I на термоциклере Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, Австралия). В качестве стандарта использовали мРНК фактора элонгации EF-1α (AF120093.1), уровень экспрессии которого принимали за 100%. Последовательности использованных праймеров для выявления методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией генов *PtrXTH1* и *EF-1α* также были опубликованы ранее [6]. В итоге для дальнейших экспериментов нами взяты четыре линии трансгенных растений табака, которые характеризовались наиболее высоким уровнем содержания транскриптов гена *PtrXTH1* в корнях: линия 3 – 166%, линия 17 – 181%, линия 25 – 154%, линия 28 – 122%. В остальных линиях трансгенных растений уровень содержания транскриптов гена *PtrXTH1* в корнях не превышал 100%.

Оценка параметров роста корней трансгенных растений табака при действии абиотических стрессов. Трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* поколения T₂ проращивали в камерах роста Binder (Германия) при температуре 25 °С, освещенности 140 мкмоль/(м²с) и фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) на питательной среде МС. Через 10 дней проращивания на селективной среде с гигромицином проростки с одинаковыми размерами корней переносили на вертикально-ориентированные чашки Петри со средой МС. После 10 дней выращивания определяли прирост корней (изменение длины) при норме (контроль), при действии хлорида натрия (NaCl) в концентрации 50 и 100 мМ, при воздействии гипотермии (12 °С) и при влиянии ацетата кадмия (CdAc) в концентрациях 200 и 400 мкМ [11]. Измерение длины корней проводили перед началом эксперимента и после 10 дней опыта. При оценке результатов эксперимента учитывался только прирост корней за эти 10 дней. В качестве контроля (дикий тип) использовались растения табака *N. tabacum* сорта Petit Havana линии SR1 дикого типа. Выборка составила 100 растений для каждой линии. Результаты исследований представляли в виде гистограмм со средними значениями выборки. Барами обозначали стандартную ошибку среднего. Достоверность различий во всех экспериментах оценивали по тесту Дункана ($P < 0,05$) [12].

При нормальных условиях достоверное увеличение длины корней по сравнению с растениями дикого типа выявлено у линий 3, 17 и 25 (рис. 1, а). Оценка прироста корней трансгенных растений табака при действии температуры 12 °С показала, что длина по сравнению с диким типом увеличивается у всех исследуемых линий (рис. 1, б). При выращивании растений на среде МС с добавлением 50 мМ NaCl увеличение длины корней по сравнению с диким типом обнаружено у линий 3 и 17 (рис. 1, с). При действии 100 мМ NaCl больший прирост корней, чем у дикого типа, наблюдался у линий 3, 17 и 25 (рис. 1, d). При выращивании растений на среде МС с добавлением CdAc в концентрации 200 мкМ повышенные показатели прироста корней по сравнению с диким типом выявлены у всех изучаемых линий трансгенных растений табака (рис 1, е). При действии 400 мкМ

CdAc более быстрыми темпами роста корней по сравнению с диким типом характеризовались линии 3 и 28 трансгенных растений (рис. 1, f).

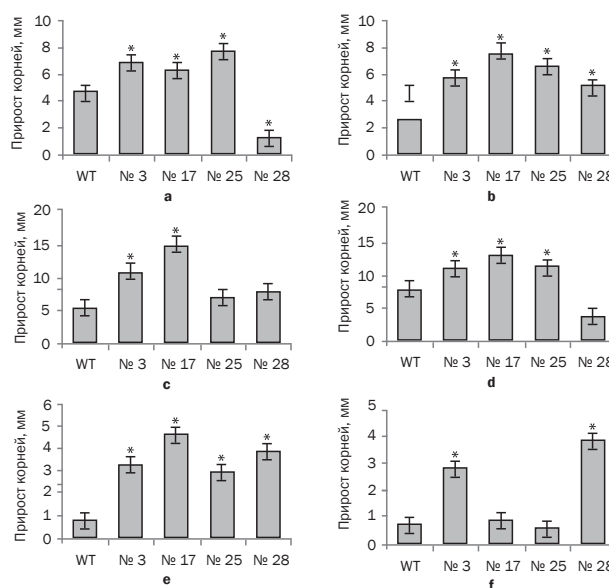


Рис. 1. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* за 10 дней: а – нормальные условия; б – воздействие 12 °С; с – влияние 50 мМ NaCl; d – влияние 100 мМ NaCl; е – влияние 200 мкМ CdAc; f – влияние 400 мкМ CdAc (WT – дикий тип; цифрами по оси абсцисс отмечены номера линий трансгенных растений; * – $P < 0,05$ согласно тесту Дункана)

Fig. 1. Roots growth of transgenic tobacco plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene for 10 days: a – normal conditions; b – the effect of 12 °С; c – the effect of 50 mM NaCl; d – the effect of 100 mM NaCl; e – the effect of 200 μM CdAc; f – the effect of 400 μM CdAc (WT – wild-type; the numbers on the x-axis indicate the line numbers of transgenic plants; * – $P < 0.05$ according to the Duncan test)

Фиксация и микроскопический анализ корней. Фиксацию корней табака проводили в 4%-м формалине на фосфатном буфере (pH 7,2) в течение 4 ч при комнатной температуре. Затем корни переносили в 30%-й глицерин, приготовленный на 2%-м диметилсульфоксиде, и выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Готовили «просветляющий раствор» следующего состава: 3,7 М KI и 12,5 мМ Na₂S₂O₃ в 100 мл 2%-го диметилсульфоксида. Потом корни переносили в «просветляющий раствор» для подготовки к просмотру препаратов под микроскопом. Затем 35 мл «просветляющего раствора» смешивали с 65 мл 100%-го глицерина. Корни табаков выдерживали в «просветляющем растворе» не меньше 1,5 ч, после чего готовили временные препараты в 50%-м глицерине [13]. Размер клеток корней изучали в вариантах: оптимальные условия роста, рост при засолении 50 мМ NaCl, при воздействии низкой положительной температуры 12 °С и при действии 200 мкМ CdAc. Каждая повторность включала в себя по 10 корней на каждый вариант опыта ($n = 10$). Измерения размеров клеток паренхимы корней проводили в зоне всасы-

вания. Размер и площадь клеток анализировали на флуоресцентном микроскопе Biozero BZ-8100 (Кеуенсе, Япония). По результатам экспериментов проанализировано по 150 клеток на каждую вариацию опыта исследованных растений ($n = 150$). Анализ и фиксация клеток проводились через 10 дней после посадки на вертикально-ориентированные чашки Петри. Форма клеток корней была цилиндрическая, вытянутая при всех вариациях опыта, как у табака дикого типа, так и у трансгенных растений (рис. 2).

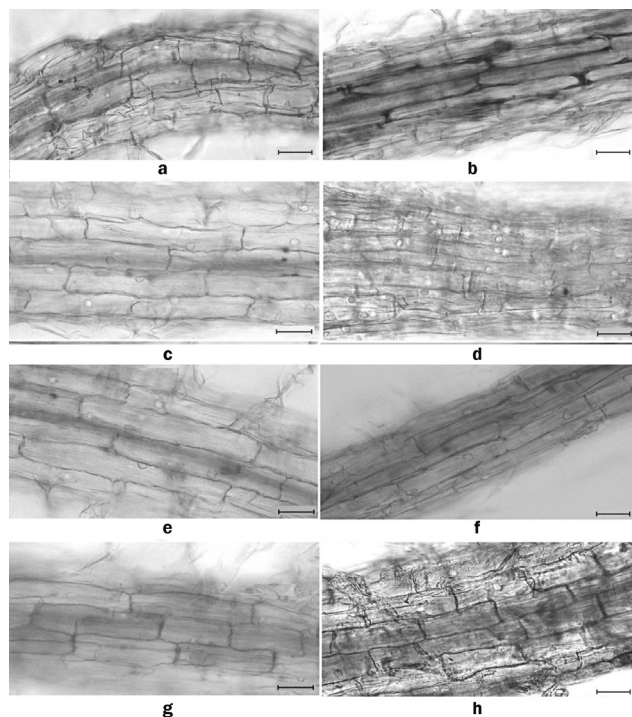


Рис. 2. Размеры и форма клеток корней табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1*: а – корни табака дикого типа при нормальных условиях; б – корни трансгенного табака при нормальных условиях; в – корни табака дикого типа при воздействии 50 мМ NaCl; д – корни трансгенного табака при воздействии 50 мМ NaCl; е – корни табака дикого типа при гипотермии 12 °С; ф – корни трансгенного табака при гипотермии 12 °С; г – корни табака дикого типа при воздействии 200 мкМ CdAc; h – корни трансгенного табака при воздействии 200 мкМ CdAc (увеличение 160х, масштаб 50 мкм)

Fig. 2. Size and shape of the cells of wild-type tobacco and transgenic plants roots with overexpression of the *PtrXTH1* gene: а – wild-type tobacco roots under normal conditions; б – transgenic tobacco roots under normal conditions; в – wild-type tobacco roots exposed to 50 mM NaCl; д – transgenic tobacco roots exposed to 50 mM NaCl; е – wild-type tobacco roots exposed to 12 °C; ф – transgenic tobacco roots exposed to 12 °C; г – wild-type tobacco roots exposed to 200 μ M CdAc; h – roots of transgenic tobacco exposed to 200 μ M CdAc (magnification 160x, scale 50 μ m)

При воздействии 200 мкМ CdAc размеры клеток у трансгенных растений табака со сверхэкспрессией изучаемого гена были больше по сравнению с растениями табака дикого типа (таблица). При действии

засоления и гипотермии разница в размерах клеток между трансгенными растениями и растениями дикого типа не обнаруживалась.

Площадь клеток корней растений табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* при нормальных условиях и при воздействии различных абиотических стресс-факторов

Area of tobacco root cells of wild-type and transgenic plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene under normal conditions and under the influence of various abiotic stress factors

Условия проведения эксперимента	Дикий тип, мкм ²	Трансгенные растения 35S::PtrXTH1, мкм ²
Нормальные условия	2836,8 $\pm$ 873,3	2777,4 $\pm$ 662,2
Засоление (50 мМ NaCl)	2669,3 $\pm$ 1080,2	2537,2 $\pm$ 677,2
Гипотермия (12 °С)	2743,2 $\pm$ 797,4	2685,7 $\pm$ 744,3
Загрязнение кадмием (200 мкМ CdAc)	2959,1 $\pm$ 755,2	3930,3 $\pm$ 1077,7*

Примечание. * – $P < 0,05$.

Анализ содержания белка и компонентов антиоксидантной системы трансгенных растений табака в условиях абиотических стрессов. Для определения активности фермента супероксиддисмутазы использовали метод, описанный С. Чевари с соавторами [14]. Активность гваяколпероксидаз определяли по способности полимеризации гваякола до тетрагваякола [15]. Активность аскорбатпероксидаз определялась по методу С. Верма и Р.С. Дуби [16]. Содержание водорастворимых сахаров определяли по методике, описанной М. Дюбуа с соавторами [17] Активность каталаз определяли по скорости деградации молекул H₂O₂ [18]. Активность глутатион-S-трансфераз определяли по скорости образования глутатион-S-конъюгатов, образовавшихся между восстановленным глутатионом и 1-хлор-2,4-динитробензолом [19]. Количество окисленного и восстановленного глутатиона определяли по методике Н.В. Шалыго и др. [20]. Содержание малонового диальдегида измеряли с использованием тиобарбитуровой кислоты по методу, описанному в работе Н.Л. Тейлора и А.Х. Миллара [21]. Методика определения количества пролина взята из работы Л.С. Бэйтса и др. [22] с модификациями А.Х.А. Хедра и др. [23]. Оценку общей антиоксидантной способности проводили на метанольных (80%) экстрактах по восстановлению молибдена (VI) до молибдена (V) в кислой среде [24]. Содержание количества общего растворимого белка измеряли по методу М.М. Брэдфорда [25].

По результатам оценки содержания белка (рис. 3, а) выявлено, что в корнях трансгенных растений происходит большее его накопление при действии абиотических стрессов, чем у растений дикого типа, в то время как при нормальных условиях содержание белка в трансгенных растениях находится на уровне растений дикого типа. В корнях трансгенного табака обнаружена повышенная по сравнению с диким типом общая антиоксидантная способность как при нормальных условиях, так и при воздействии засоления, гипотермии

и тяжелых металлов (рис. 3, b). Содержание пролина (рис. 3, c) было выше в трансгенных растениях со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* как при нормальных условиях, так и при воздействии гипотермии и засоления по сравнению с диким типом. При действии CdAc содержание пролина в корнях трансгенных растений существенно не отличалось от дикого типа. При нормальных условиях содержание водорастворимых сахаров (рис. 3, d) в трансгенных растениях табака было меньше по сравнению с растениями дикого типа. При влиянии засоления и гипотермии содержание водорастворимых сахаров в трансгенных растениях становилось выше по сравнению с диким типом. При действии CdAc происходило повышение содержания водорастворимых сахаров в диком типе, но в трансгенных растениях количество водорастворимых сахаров уменьшалось по сравнению с нормальными условиями. Содержание малонового диальдегида (рис. 3, e) при нормальных условиях было в 4 раза больше в корнях трансгенных растений табака по сравнению с диким типом. При воздействии стрессовых факторов содержание малонового диальдегида в трансгенных растениях становилось меньше, чем при нормальных условиях, но в то же время оставалось выше показателей дикого типа при тех же стрессовых условиях.

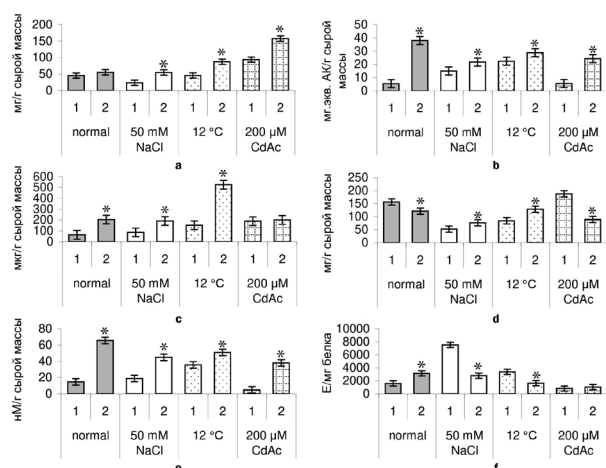


Рис. 3. Содержание белка и водорастворимых сахаров, а также анализ компонентов антиоксидантной системы в корнях растений табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* при нормальных условиях (normal), при воздействии 50 mM NaCl, 12 °C, 200 мкМ CdAc: а – содержание белка; б – общая антиоксидантная способность; с – содержание пролина; d – содержание водорастворимых сахаров; e – содержание малонового диальдегида; f – активность каталазы; 1 – дикий тип, 2 – трансгенные растения (* – $P < 0,05$ согласно тесту Дункана)

Fig. 3. Content of protein, water-soluble sugars and analysis of the antioxidant system in the roots of wild-type tobacco and transgenic plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene under normal conditions (normal), in response to 50 mM NaCl, 12 °C, 200 μM CdAc: a – protein content; b – total antioxidant capacity; c – proline content; d – water-soluble sugars content; e – malondialdehyde content; f – catalase activity; 1 – wild-type, 2 – transgenic plants (* – $P < 0.05$ according to the Duncan test)

При нормальных условиях каталазная активность была выше у трансгенных растений по сравнению с диким типом, но при воздействии засоления и гипотермии у трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* активность каталазы была существенно ниже, чем у дикого типа (рис. 3, f). При воздействии кадмия разницы между растениями дикого типа и трансгенными растениями не выявлено.

Активность аскорбатпероксидаз (рис. 4, a) была больше в трансгенных растениях при нормальных условиях по сравнению с растениями дикого типа, при воздействии стресс-факторов их активность снизилась и уменьшилась по сравнению с диким типом. Активность глутатион-S-трансфераз (рис. 4, b) и гваяколпероксидаз (рис. 4, c) в трансгенных растениях табака при нормальных условиях не отличалась от дикого типа. При воздействии абиотических стресс-факторов у трансгенных растений активность данных ферментов была существенно ниже, чем у растений дикого типа, у которых наблюдалось повышение активности ферментов при воздействии каждого из трех стресс-факторов.

В нормальных условиях содержание восстановленного (рис. 4, d) и окисленного глутатиона (рис. 4, e) в трансгенных растениях было намного выше, чем у

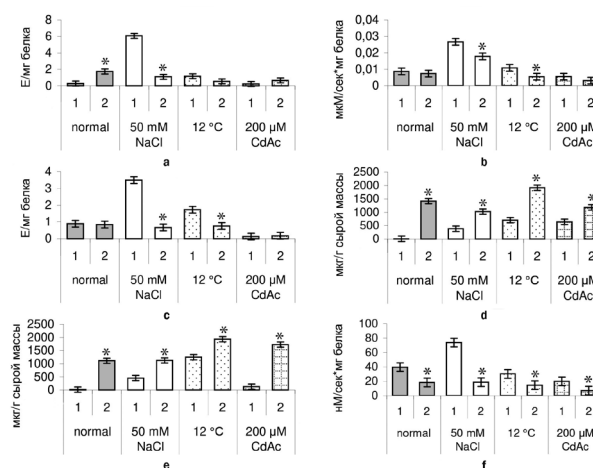


Рис. 4. Анализ компонентов антиоксидантной системы в корнях растений табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* при нормальных условиях (normal), при воздействии 50 mM NaCl, 12 °C, 200 мкМ CdAc: а – активность аскорбатпероксидаз; б – активность глутатион-S-трансфераз; с – активность гваяколпероксидаз; d – содержание восстановленного глутатиона; e – содержание окисленного глутатиона; f – активность супероксиддисмутазы; 1 – дикий тип, 2 – трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* (* – $P < 0,05$ согласно тесту Дункана)

Fig. 4. Analysis of the antioxidant system in wild-type tobacco roots and transgenic plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene under normal conditions, under the influence of 50 mM NaCl, 12 °C, 200 μM CdAc: a – ascorbate peroxidases activity; b – glutathione-S-transferases activity; c – guaiacol peroxidases activity; d – content of reduced glutathione; e – content of oxidized glutathione; f – superoxide dismutase activity; 1 – wild-type, 2 – transgenic plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene (* – $P < 0.05$ according to the Duncan test)

растений дикого типа. При засолении у растений дикого типа происходило резкое увеличение обеих форм глутатиона, тогда как у трансгенных растений содержание глутатиона оставалось на том же уровне или даже немного уменьшалось (см. рис. 4, d). При действии гипотермии и кадмия мы обнаружили большее содержание восстановленного и окисленного глутатиона у трансгенных растений по сравнению с диким типом. Активность фермента супероксиддисмутазы была меньше у трансгенных растений табака по сравнению с диким типом как при нормальных условиях, так и при действии абиотических стресс-факторов (рис. 4, f).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Корни при сверхэкспрессии гена *PtrXTH1* росли быстрее, а микроскопический анализ показал, что размеры клеток корней у трансгенных растений крупнее, чем у растений дикого типа, только при действии кадмия. Это означает, что сверхэкспрессия гена *PtrXTH1* способствовала улучшению роста корней за счет не только стимуляции роста клеток растяжением, но и клеточного деления, что соотносится с нашими предыдущими данными по гену *NtEXGT*. Сверхэкспрессия гена *PtrXTH1* способствовала увеличению содержания белка, пролина, обеих форм глутатиона, водорастворимых сахаров. Это говорит о позитивных изменениях в антиоксидантной системе, что, в свою очередь, является необходимой предпосылкой для активного роста растения. Ранее не сообщалось о позитивном влиянии генов ксиллоглюканэндотрансгликозилаз на глутатионовый пул и содержание пролина и водорастворимых сахаров в растениях. Механизм данного явления пока остается неясным. В литературе присутствует большое количество статей о влиянии различных абиотических стрессов на глутатионовый пул и пролин различных растений [26], но нет работ, в которых использовались трансгенные растения со сверхэкспрессией ксиллоглюканэндотрансгликозилаз. Таким образом, нами обнаружен механизм ответа растения на воздействие абиотических факторов при высоком уровне экспрессии гена ксиллоглюканэндотрансгликозилаз. Обнаруженное нами повышение общей антиоксидантной способности соотносится с увеличением количества пролина и глутатиона. Увеличение содержания пролина в трансгенных растениях со сверхэкспрессией генов ксиллоглюканэндотрансгликозилаз в ответ на воздействие кадмия выявлено в ранее проводимом нами исследовании [27]. Содержание свободного пролина многократно повышается в клетках растений в ответ на влияние абиотических стрессов, что показывает чувствительность растений к данным стрессам. Эти данные могут говорить о наличии защитного эффекта ксиллоглюканэндотрансгликозилаз при действии абиотических стресс-факторов (таких как засоление и гипотермия), который реализуется не только через стимуляцию роста, но и за счет влияния на компоненты антиоксидантной системы.

При повышении экспрессии ксиллоглюканэндотрансгликозилаз происходит усиленное расщепление ксиллоглюканов, что дает сигнал для роста растения [1]. Данный сигнал стимулирует размягчение клеточной стенки, что ведет к росту клеточной стенки и корня в целом. Растение растет за счет увеличения экспрессии многочисленных генов – регуляторов роста, происходит одновременная активация деления клеток и растя-

жения клеточных стенок растений. При этом растению важно, чтобы при интенсивном росте не происходило большого накопления активных форм кислорода, которые угнетают его жизнедеятельность. В связи с вышесказанным растение – видимо, в этот период – повышает свой антиоксидантный статус, прежде всего за счет увеличения содержания пролина, глутатиона и, возможно, других компонентов антиоксидантной системы, так как общая антиоксидантная способность у трансгенных растений имела высокие значения, что в целом является показателем повышенного антиоксидантного статуса. Также для стабилизации внутриклеточных структур важное значение имеет накопление защитных веществ, таких как водорастворимые сахара, которые используются растениями для упрочнения связей между белками, липидами и хлорофиллом. В то же время в трансгенных растениях зафиксировано уменьшение активностей каталаз, аскорбатпероксидазы, гваяколпероксидазы, глутатион-S-трансферазы и супероксиддисмутазы. Вероятно, ксиллоглюканэндотрансгликозилазы оказывают защитный эффект на растения в условиях абиотических стрессов, в том числе благодаря влиянию на содержание пролина, водорастворимых сахаров, глутатиона. В итоге трансгенные растения могут не нуждаться в столь высокой активности некоторых антиоксидантных ферментов. Таким образом, в ответ на размягчение клеточных стенок происходит активация роста и деления клеток корней. При действии стрессовых факторов клетки корней трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* могут дольше не останавливать свой рост, нежели растения дикого типа, вероятно, благодаря более рыхлому состоянию клеточных стенок. При воздействии абиотических стресс-факторов в растении происходят негативные окислительные процессы, в том числе в результате интенсивного фотосинтеза, дыхания и роста, что, возможно, является причиной выявленного нами более высокого содержания малонового диальдегида у трансгенных растений. Для противодействия этому, вероятно, активируются пролин, водорастворимые сахара и глутатион. Однако механизмы прямого влияния ксиллоглюканэндотрансгликозилаз на их биосинтез и активность пока неизвестны. Следует отметить, что в стрессовых условиях малоновый диальдегид в трансгенных растениях вырабатывался все же менее активно, чем в нормальных условиях, что еще раз может свидетельствовать о протекторном эффекте гена *PtrXTH1*. Повышенное содержание белка в корнях трансгенных растений может быть обусловлено также наличием активно растущих клеток, которые обычно синтезируют больше белка. С другой стороны, повышенное содержание пролина, глутатиона и водорастворимых сахаров, видимо, защищает белки от разрушения, что также может способствовать увеличению их содержания в корнях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Конститутивная экспрессия гена *PtrXTH1* улучшает рост корней за счет стимуляции деления и растяжения клеток и повышает устойчивость растений к засолению, гипотермии и кадмию. Этот положительный эффект объясняется комплексным действием продукта гена ксиллоглюканэндотрансгликозилазы *PtrXTH1* на клеточные стенки и антиоксидантную систему.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Van Sandt V.S.T., Suslov D., Verbelen J.-P., Visenberg K. Xyloglucan endotransglucosylase activity loosens a plant cell wall // *Annals of Botany*. 2007. Vol. 100. P. 1467–1473. DOI: 10.1093/aob/mcm248.
2. Cho S.K., Kim J.E., Park J.-A., Eom T.J., Kim W.T. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper *CsXTH3*, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants // *FEBS Letters*. 2006. Vol. 580, no. 13. P. 3136–3144. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.04.062.
3. Han Y., Ban Q., Hou Y., Meng K., Suo J., Rao J. Isolation and characterization of two persimmon xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (*XTH*) genes that have divergent functions in cell wall modification and fruit post-harvest softening // *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7. P. 624. DOI: 10.3389/fpls.2016.00624.
4. Han Y., Han S., Ban Q., He Y., Jin M., Rao J. Overexpression of persimmon *DkXTH1* enhanced tolerance to abiotic stress and delayed fruit softening in transgenic plants // *Plant Cell Reports*. 2017. Vol. 36. P. 583–596. DOI: 10.1007/s00299-017-2105-4.
5. Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Berezhneva Z.A., Nikonorov Y.M., Postrigan B.N., Kudoyarova G.R., et al. Expression profiles and hormonal regulation of tobacco *NtEXGT* gene and its involvement in abiotic stress response // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2017. Vol. 111. P. 203–215. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.12.005.
6. Кулуев Б.Р., Бережнева З.А., Князев А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис А.В. Участие генов ксиланглюканэндотрансглюкозилаз *PtrXTH1* и *PnXTH1* в регуляции роста и адаптации растений к стресс-факторам // *Физиология растений*. 2018. Т. 65. N 1. С. 26–37. DOI: 10.7868/S0015330318010037. EDN: YMTJBE.
7. Han Y., Wang W., Sun J., Ding M., Zhao R., Deng S., et al. *Populus euphratica* XTH overexpression enhances salinity tolerance by the development of leaf succulence in transgenic tobacco plants // *Journal of Experimental Botany*. 2013. Vol. 64, no. 14. P. 4225–4238. DOI: 10.1093/jxb/ert229.
8. Yang K.A., Lim C.J., Hong J.K., Park C.Y., Cheong Y.H., Chung W.S., et al. Identification of cell wall genes modified by a permissive high temperature in Chinese cabbage // *Plant Science*. 2006. Vol. 171, no. 1. P. 175–182. DOI: 10.1016/J.PLANTSCI.2006.03.013.
9. Dong J., Jiang Y., Chen R., Xu Z., Gao X. Isolation of a novel xyloglucan endotransglucosylase (*OsXET9*) gene from rice and analysis of the response of this gene to abiotic stresses // *African Journal of Biotechnology*. 2011. Vol. 10, no. 76. P. 17424–17434. DOI: 10.5897/AJB11.1242.
10. Wang M., Xu Z., Ding A., Kong Y. Genome-wide identification and expression profiling analysis of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) // *Genes*. 2018. Vol. 9, no. 6. P. 273. DOI: 10.3390/genes9060273.
11. Бережнева З.А., Кашафутдинова А.Р., Кулуев Б.Р. Рост корней трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L. с конститутивной экспрессией гена глутатионсинтетазы рапса *BnGSH* при действии стрессовых факторов // *Вестник защиты растений*. 2017. N 3. С. 55–59. EDN: ZIFWJZ.
12. Duncan D.B. Multiple range and multiple *F* test // *Biometrics*. 1955. Vol. 11, no. 1. P. 1–42. DOI: 10.2307/3001478.
13. Филин А.Н., Иванов В.Б. Влияние 2,4-Д на пролиферацию и растяжение клеток в корнях *Arabidopsis thaliana* // *Физиология растений*. 2016. Т. 63. N 1. С. 174–179. DOI: 10.7868/S0015330316010061. EDN: UXHEKT.
14. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // *Лабораторное дело*. 1985. N 11. С. 678–681.
15. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перианский Ю.В., Луковникова Г.А., Смирнова-Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.
16. Verma S., Dubey R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants // *Plant Science*. 2003. Vol. 164, no. 4. P. 645–655. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00022-0.
17. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Roberts P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances // *Analytical Chemistry*. 1956. Vol. 28, no. 3. P. 350–356. DOI: 10.1021/AC60111A017.
18. Panchuck I.I., Volkov R.A., Schöffel F. Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. 2002. Vol. 129, no. 2. P. 838–853. DOI: 10.1104/pp.001362.
19. Habig W.H., Pabst M.S., Jakoby W.B. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // *Journal of Biological Chemistry*. 1974. Vol. 249, no. 22. P. 7130–7139.
20. Шалыго Н.В., Щербakov P.A., Доманская И.Н., Радюк М.С. Спектрофлуориметрический метод определения окисленного и восстановленного глутатиона в растениях // *Физиология и биохимия культурных растений*. 2007. Т. 39. N 3. С. 264–270.
21. Taylor N.L., Millar A.H. Oxidative stress and plant mitochondria // *Mitochondria. Methods in Molecular Biology* / eds D. Leister, J.M. Herrmann. Humana Press, 2007. Vol. 372. P. 389–403. DOI: 10.1007/978-1-59745-365-3_28.
22. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // *Plant and Soil*. 1973. Vol. 39. P. 205–207. DOI: 10.1007/BF00018060.
23. Khedr A.H.A., Abbas M.A., Wahid A.A.A., Quick W.P., Abogadallah G.M. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress // *Journal of Experimental Botany*. 2003. Vol. 54, no. 392. P. 2553–2562. DOI: 10.1093/jxb/erg277.
24. Boestfleisch C., Wagenseil N.B., Buhmann A.K., Seal C.E., Wade E.M., Muscolo A., et al. Manipulating the antioxidant capacity of halophytes to increase their cultural and economic value through saline cultivation // *AoB Plants*. 2014. Vol. 6. DOI: 10.1093/aobpla/plu046.
25. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 1976. Vol. 72, no. 1-2. P. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
26. Швеиц Д.Ю., Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Влияние *rol*-генов *Agrobacterium rhizogenes* штаммов A4, 15834 и K599 на рост корней трансгенных растений табака и состояние антиоксидантной системы в условиях абиотического стресса // *Физиология растений*. 2024. Т. 71. N 5. С. 632–646. DOI: 10.31857/S0015330324050111. EDN: MLUDPV.

27. Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Рост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансглюко-

зилаз в условиях кадмиевого стресса // Физиология растений. 2022. Т. 69. N 5. С. 522–530. DOI: 10.31857/S0015330322050037. EDN: OVOZAD.

REFERENCES

1. Van Sandt V.S.T., Suslov D., Verbelen J.-P., Visenberg K. Xyloglucan endotransglucosylase activity loosens a plant cell wall. *Annals of Botany*. 2007;100:1467-1473. DOI: 10.1093/aob/mcm248.
2. Cho S.K., Kim J.E., Park J.-A., Eom T.J., Kim W.T. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper *CaXTH3*, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *FEBS Letters*. 2006;580(13):3136-3144. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.04.062.
3. Han Y., Ban Q., Hou Y., Meng K., Suo J., Rao J. Isolation and characterization of two persimmon xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (*XTH*) genes that have divergent functions in cell wall modification and fruit post-harvest softening. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:624. DOI: 10.3389/fpls.2016.00624.
4. Han Y., Han S., Ban Q., He Y., Jin M., Rao J. Overexpression of persimmon *DkXTH1* enhanced tolerance to abiotic stress and delayed fruit softening in transgenic plants. *Plant Cell Reports*. 2017;36:583-596. DOI: 10.1007/s00299-017-2105-4.
5. Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Berezhneva Z.A., Nikonov Y.M., Postrigan B.N., Kudoyarova G.R., et al. Expression profiles and hormonal regulation of tobacco *NtEXGT* gene and its involvement in abiotic stress response. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2017;111:203-215. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.12.005.
6. Kuluev B.R., Berezhneva Z.A., Knyazev A.V., Nikonov Y.M., Chemeris A.V. Role of *PtrXTH1* and *PnXTH1* genes encoding xyloglucan endo-transglycosylases in regulation of growth and adaptation of plants to stress factors. *Fiziologiya rastenii*. 2018;65(1):26-37. (In Russian). DOI: 10.7868/S0015330318010037. EDN: YMTJBE.
7. Han Y., Wang W., Sun J., Ding M., Zhao R., Deng S., et al. *Populus euphratica* XTH overexpression enhances salinity tolerance by the development of leaf succulence in transgenic tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(14):4225-4238. DOI: 10.1093/jxb/ert229.
8. Yang K.A., Lim C.J., Hong J.K., Park C.Y., Cheong Y.H., Chung W.S., et al. Identification of cell wall genes modified by a permissive high temperature in Chinese cabbage. *Plant Science*. 2006;171(1):175-182. DOI: 10.1016/J.PLANTSCI.2006.03.013.
9. Dong J., Jiang Y., Chen R., Xu Z., Gao X. Isolation of a novel xyloglucan endotransglucosylase (*OsXET9*) gene from rice and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(76):17424-17434. DOI: 10.5897/AJB11.1242.
10. Wang M., Xu Z., Ding A., Kong Y. Genome-wide identification and expression profiling analysis of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Genes*. 2018;9(6):273. DOI: 10.3390/genes9060273.
11. Berezhneva Z.A., Kashafutdinova A.R., Kuluev B.R. Root growth in *Nicotiana tabacum* transgenic plants with overexpression of *BnGSH* gene of oilseed rape glutathione synthetase under stress factors. *Plant Protection News*. 2017;3:55-59. (In Russian). EDN: ZIFWJZ.
12. Duncan D.B. Multiple range and multiple *F* test. *Biometrics*. 1955;11(1):1-42. DOI: 10.2307/3001478.
13. Filin A.N., Ivanov V.B. Effect of 2,4-D on cell proliferation and elongation in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Fiziologiya rastenii*. 2016;63(1):174-179. (In Russian). DOI: 10.7868/S0015330316010061. EDN: UXXEKT.
14. Chevari S., Chaba I., Sekel I. Role of superoxide dismutase in cellular oxidative processes and method of its determination in biological materials. *Laboratornoe delo*. 1985;11:678-681. (In Russian).
15. Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Yarosh N.P., Perunskii Yu.V., Lukovnikova G.A., Smirnova-Ikonnikova M.I. *Methods for biochemical research of plants*. Leningrad: Agropromizdat; 1987, 430 p. (In Russian).
16. Verma S., Dubey R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alter the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*. 2003;164(4):645-655. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00022-0.
17. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*. 1956;28(3):350-356. DOI: 10.1021/AC60111A017.
18. Panchuck I.I., Volkov R.A., Schöffel F. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2002;129(2):838-853. DOI: 10.1104/pp.001362.
19. Habig W.H., Pabst M.S., Jakoby W.B. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 1974;249(22):7130-7139.
20. Shalygo N.V., Shcherbakov R.A., Domanskaya I.N., Radyuk M.S. Spectrofluorimetric method for the determination of oxidized and reduced glutathione in plants. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii*. 2007;39(3):264-270. (In Russian).
21. Taylor N.L., Millar A.H. Oxidative stress and plant mitochondria. In: Leister D., Herrmann J.M. (eds). *Mitochondria. Methods in Molecular Biology*. Humana Press; 2007, vol. 372, p. 389-403. DOI: 10.1007/978-1-59745-365-3_28.
22. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973;39:205-207. DOI: 10.1007/BF00018060.
23. Khedr A.H.A., Abbas M.A., Wahid A.A.A., Quick W.P., Abogadallah G.M. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany*. 2003;54(392):2553-2562. DOI: 10.1093/jxb/erg277.
24. Boestfleisch C., Wagenseil N.B., Buhmann A.K., Seal C.E., Wade E.M., Muscolo A., et al. Manipulating the antioxidant capacity of halophytes to increase their cultural and economic value through saline cultivation. *AoB Plants*. 2014;6. DOI: 10.1093/aobpla/plu046.
25. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1-2):248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

26. Shvets D.Yu., Berezhneva Z.A., Musin Kh.G., Kuluev B.R. Effect of *rol* genes of the A4, 15834, and K599 strains of *Agrobacterium rhizogenes* on root growth and states of the antioxidant systems of transgenic tobacco plants subjected to abiotic stress. *Fiziologiya rastenii*. 2024;71(5):632-646. (In Russian). DOI: 10.31857/S0015330324050111. EDN: MLUDPV.

27. Berezhneva Z.A., Musin kh.G., Kuluev B.R. Root growth of transgenic tobacco plants with overexpression of expansin and xyloglucan endotransglycosylase genes under cadmium stress. *Fiziologiya rastenii*. 2022;69(5):522-530. (In Russian). DOI: 10.31857/S0015330322050037. EDN: OVOZAD.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Бережнева Зоя Александровна,
младший научный сотрудник,
Институт биохимии и генетики Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450054, г. Уфа, Проспект Октября, 71,
Российская Федерация,
berezheva-z@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2634-9860>

Мусин Халит Галеевич,
к.б.н., научный сотрудник,
Институт биохимии и генетики Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450054, Уфа, Проспект Октября, 71,
Российская Федерация,
khalit.musin@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7336-2027>

Кулуев Булат Разяпович,
д.б.н., заведующий лабораторией,
Институт биохимии и генетики Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450054, Уфа, Проспект Октября, 71,
Российская Федерация,
✉ kuluev@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Zoya A. Berezhneva,
Junior Researcher,
Institute of Biochemistry and Genetics,
Ufa Federal Research Center RAS,
71, Oktyabrya Avenue, Ufa, 450054,
Russian Federation,
berezheva-z@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2634-9860>

Khalit G. Musin,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Institute of Biochemistry and Genetics,
Ufa Federal Research Center RAS,
71, Oktyabrya Avenue, Ufa, 450054,
Russian Federation,
khalit.musin@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7336-2027>

Bulat R. Kuluev,
Dr. Sci. (Biology), Head of the Laboratory,
Institute of Biochemistry and Genetics,
Ufa Federal Research Center RAS,
71, Oktyabrya Avenue, Ufa, 450054,
Russian Federation,
✉ kuluev@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

Вклад авторов

З.А. Бережнева – постановка эксперимента по выращиванию и стресс-обработке растений, морфометрический анализ, микроскопия, написание статьи.
Х.Г. Мусин – биохимический анализ антиоксидантной системы.
Б.Р. Кулуев – создание трансгенных растений, написание и редактирование статьи.

Contribution of the authors

Zoya A. Berezhneva – setting up an experiment on growing and stress-treating plants, morphometric analysis, microscopy, writing the text of manuscript.
Khalit G. Musin – biochemical analysis of the antioxidant system.
Bulat R. Kuluev – creation of transgenic plants, writing and editing the text of manuscript.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict interests

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

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

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

Информация о статье

Поступила в редакцию 21.08.2023.
Одобрена после рецензирования 06.12.2023.
Принята к публикации 30.11.2024.

Information about the article

The article was submitted 21.08.2023.
Approved after reviewing 06.12.2023.
Accepted for publication 30.11.2024.

Научная статья
УДК 577.114
EDN: PZKEDW
DOI: 10.21285/achb.947



Биотехнологическая трансформация биомассы мискантуса гигантского в бактериальную наноцеллюлозу

Н.А. Шавыркина***, Е.К. Гладышева*, А.А. Зенкова***, Е.А. Скиба*✉

*Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, Бийск, Российская Федерация

**Бийский технологический институт (филиал) Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова, Бийск, Российская Федерация

Аннотация. Биотехнологическая трансформация растительного сырья является одним из наиболее перспективных промышленных процессов получения высокоценных продуктов из недорогого растительного сырья. Целью проведенной работы являлся анализ биотрансформации мискантуса гигантского в высокоценную бактериальную наноцеллюлозу от исходного сырья до конечного продукта, то есть представление полного цикла переработки растительного сырья. Изначально был определен химический состав биомассы мискантуса гигантского, содержание целлюлозы в ней составило 54%. Далее осуществляли биотрансформацию в три этапа: на первом этапе биомассу мискантуса гигантского подвергали предварительной обработке четырьмя способами; далее полученные субстраты подвергали ферментативному гидролизу в одинаковых условиях и получали углеводные питательные среды; на завершающем этапе проводили биосинтез бактериальной наноцеллюлозы на полученных питательных средах посредством симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12. В результате было выявлено, что химическая предобработка с помощью разбавленных растворов азотной кислоты и гидроксида натрия является чрезвычайно эффективной и позволяет повысить реакционную способность к ферментативному гидролизу в 28–31 раз по сравнению с нативным мискантусом. Однозначно показано, что в технологии получения бактериальной наноцеллюлозы из мискантуса гигантского предварительную обработку биомассы необходимо проводить в одну стадию разбавленным раствором азотной кислоты. В этом случае выход субстрата из исходного сырья для последующего гидролиза составляет 50%, извлечение редуцирующих сахаров из биомассы мискантуса максимально (65,2%) и выход бактериальной наноцеллюлозы в 1,1–1,3 раза выше, чем при трех других способах предобработки биомассы.

Ключевые слова: мискантус гигантский, биотрансформация, бактериальная наноцеллюлоза, химическая предварительная обработка

Финансирование. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>.

Для цитирования: Шавыркина Н.А., Гладышева Е.К., Зенкова А.А., Скиба Е.А. Биотехнологическая трансформация биомассы мискантуса гигантского в бактериальную наноцеллюлозу // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 504–513. DOI: 10.21285/achb.947. EDN: PZKEDW.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Biotechnological transformation of giant miscanthus biomass into bacterial nanocellulose

Nadezhda A. Shavyrkin***, Evgeniya K. Gladysheva*,
Anastasia A. Zenkova***, Ekaterina A. Skiba*✉

*Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies SB RAS, Biysk, Russian Federation

**Biysk Technological Institute, Polzunov Altai State Technical University, Biysk, Russian Federation

Abstract. Biotechnological transformation of plant materials constitutes one of the most promising industrial processes for obtaining high-value products from inexpensive plant materials. The article analyzes the biotransformation

© Шавыркина Н.А., Гладышева Е.К., Зенкова А.А., Скиба Е.А., 2024

of giant miscanthus (*Miscanthus × giganteus*) into high-value bacterial nanocellulose from the feedstock to the final product, i.e., presents the complete cycle of plant material processing. First, the chemical composition of giant miscanthus biomass was determined, and the content of cellulose was found to be 54%. After that, biotransformation was performed in three stages: in the first stage, the giant miscanthus biomass was pretreated using four methods; then, the obtained substrates were subjected to enzymatic hydrolysis under the same conditions, and carbohydrate growth media were obtained; in the final stage, bacterial nanocellulose was biosynthesized in the obtained growth media using *Medusomyces gisevii* Sa-12 symbiotic culture. The chemical pretreatment with dilute solutions of nitric acid and sodium hydroxide was found to be extremely effective and increase the reactivity to enzymatic hydrolysis by 28–31 times as compared to native miscanthus. It is shown that for the production of bacterial nanocellulose from giant miscanthus, biomass should undergo one-stage pretreatment with a dilute nitric acid solution. In this case, the substrate yield from the feedstock (for subsequent hydrolysis) amounts to 50%, the extraction of reducing sugars from miscanthus biomass is maximum (65.2%), and the yield of bacterial nanocellulose is 1.1–1.3 times higher than for the other three biomass pretreatment methods.

Keywords: *Miscanthus × giganteus*, biotransformation, bacterial nanocellulose, chemical pretreatment

Funding. Russian Science Foundation supported this research (grant no. 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>).

For citation: Shavyrkina N.A., Gladysheva E.K., Zenkova A.A., Skiba E.A. Biotechnological transformation of giant miscanthus biomass into bacterial nanocellulose. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):504-513. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.947. EDN: PZKEDW.

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) – уникальный микробный полимер, который благодаря наноразмерности и химической чистоте обладает свойствами, отличными от любых растительных целлюлоз, и имеет огромный спектр применений. В связи с особенностями метаболизма продуцентов БНЦ, ее выход невысок, а себестоимость значительна, поэтому одним из путей снижения себестоимости является использование дешевого сырья. В связи с этим во всем мире активно развивается концепция трансформации дешевого целлюлозосодержащего сырья в дорогую БНЦ [1–3].

Особенно значимым данное направление является для северных стран, в которых вегетационный период очень короток, в течение него невозможно получить урожай сахаристого растительного сырья и даже получение урожая крахмалистого сырья под вопросом. В таких условиях с учетом глобальной повестки недопустима конкуренция за пищевое сырье между людьми и промышленными предприятиями, поэтому концепция трансформации дешевого целлюлозосодержащего сырья в высокомаржинальные продукты имеет не только значимость в рамках циркулярной экономики, но и острую социальную значимость [1–6].

Важным аспектом является адекватный выбор целлюлозосодержащего сырья. Мискантус гигантский – энергетическая культура, занимающая одну из ведущих мировых позиций среди целлюлозосодержащего сырья. Благодаря высокой скорости роста, содержанию целлюлозы, превышающему его содержание в древесине (50–55% против 35–50%), дешевизне возделывания объем посадок мискантуса ежегодно увеличивается во всем мире. Мискантус перерабатывается в бумагу, картон, биобетон, химические производные целлюлозы, продукты микробиологического синтеза [7–9].

Как и любой другой вид целлюлозосодержащего сырья, мискантус состоит из целлюлозы, гемицеллюлоз, лигнина, жировосковой фракции и минеральных компонентов, прочно соединенных между собой в композитную матрицу. По единодушному мнению мировых экспертов, предобработка целлюлозосодержащего сырья – это ключевая стадия, которая определяет

успех последующих стадий ферментативного гидролиза и микробиологического биосинтеза любых продуктов биотехнологической трансформации [10–12].

В данной работе впервые приводится расчет выхода полупродуктов и целевого продукта при использовании четырех способов химической предварительной обработки мискантуса и оценивается эффективность полного цикла биосинтеза БНЦ из мискантуса гигантского от сырья до целевого продукта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мискантус гигантский сорта Камис российской селекции был выращен в деревне Марушкино Московской области в 2021 году, собран в феврале 2022 года и любезно предоставлен ООО «Мастер Брэнд», г. Москва.

В данной работе исследовано четыре способа предобработки мискантуса с помощью разбавленных 4 масс.% растворов HNO_3 и NaOH при атмосферном давлении, процессы проведены в лабораторных условиях. Подробно методики изложены в работах [11, 12]. Это авторские методики, многократно воспроизведенные в лабораторных и пилотных условиях на таких видах сырья, как шелуха овса и мискантус сахароцветный сорта Сорановский. Успех переработки мискантуса гигантского был достигнут только после осуществления тщательной пробоподготовки, которая заключалась в пятикратном измельчении с помощью кормоизмельчителя КР-02 (г. Миасс, Россия) до фракции размером не более 12 мм, при этом 50% сырья было измельчено до фракции размером не более 4 мм. Компонентный состав сырья и пальпов определен стандартными «мокрыми» методами и приведен в пересчете на сухое вещество, методы описаны в работе [13].

Полученные субстраты подвергнуты ферментативному гидролизу с помощью целлюлолитических ферментных препаратов Целлюлюкс-А («Сиббиофарм», Россия) и «Ультрафло Коре» (Novozymes A/S, Дания) согласно методике, описанной в работе [11]. Особенностью в данной работе стало использование 0,05 М ацетатного буфера, так как нами было установлено, что эта концентрация благоприятно влияет на ход ферментативного гидролиза и не вызывает ингибирования биосинтеза БНЦ.

Полученные ферментативные гидролизаты были стандартизованы по редуцирующим сахарам (РС) (20 г/л) и экстрактивным веществам черного чая (1,6 г/л) и использованы в качестве питательной среды для биосинтеза БНЦ с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12, приобретенной во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Посевной материал предварительно активировали в течение 7 суток в оптимальных условиях [14] и вносили в гидролизные среды в количестве 10 об.%, в инокуляте общее количество дрожжей – 12,9–13,2 млн клеток в 1 см³, общее количество уксуснокислых бактерий – 1,6–2,2 млн клеток в 1 см³. В качестве контроля использовалась синтетическая глюкозная среда, содержащая 20 г/л глюкозы и 1,6 г/л экстрактивных веществ черного чая [15]. Биосинтез БНЦ проводили в ранее выявленных оптимальных условиях [16]: стационарные условия, температура 27 °С. Культивирование проводили в климатической камере (Binder, Германия), продолжительность культивирования составила 11 суток.

После окончания культивирования гель-пленку БНЦ снимали с поверхности питательной среды и промывали от компонентов питательной среды и клеток поэтапной обработкой 2 масс.% NaOH и 0,25 масс.% HCl с последующей промывкой дистиллированной водой до нейтральной реакции. Полученные пленки БНЦ подвергали сублимационной сушке в лиофилизаторе HR7000-M (Harvest Right LLC, Salt Lake City, США) до постоянной массы.

Выход высушенной БНЦ рассчитывали по следующей формуле:

$$W = \frac{m}{C \times V \times 0,9} \times 100\%,$$

где W – выход БНЦ, %; m – масса образца БНЦ в пересчете на абсолютно сухое вещество, г; C – концентрация редуцирующих веществ в среде в пересчете на глюкозу, г/л; V – начальный объем среды, л; 0,9 – коэффициент пересчета, обусловленный отщеплением молекулы воды при полимеризации глюкозы в целлюлозу.

Все реактивы приобретены в АО «Вектон» (г. Санкт-Петербург, Россия).

Степень полимеризации образцов БНЦ определялась вискозиметрическим методом [17] с использованием в качестве растворителя кадоксена (этилендиамин, регистрационный номер CAS 107-15-3, «Ленреактив», г. Санкт-Петербург, Россия; оксид кадмия, регистрационный номер CAS 1306-19-0, «Ленреактив», г. Санкт-Петербург, Россия).

Экспериментальные результаты получены в трехкратных повторностях, статистически обработаны с применением стандартных методов с помощью программы Microsoft Office Excel 2019.

Работа выполнена при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, г. Бийск, Россия).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На первом этапе изучили компонентный состав биомассы мискантуса гигантского и продуктов, полученных из него с использованием четырех авторских способов предобработки. Результаты представлены на рис. 1.

Предобработка азотной кислотой приводит к повышению массовой доли целлюлозы в продукте азотно-кислотной обработки (ПАО) по сравнению с сырьем в 1,5 раза (83,0% против 54,0%), к снижению содержания нецеллюлозных компонентов: пентозанов в 3,1 раза (7,4% против 22,8%), лигнина в 2,8 раза (7,5% против 21,0%), при этом доля минеральной составляющей увеличивается с 1,7 до 2,1%, что является особенностью азотнокислотной обработки [13, 14].

Предобработка гидроксидом натрия в данной работе используется в качестве арбитражного метода, так как в мировом сообществе принято, что это классический способ предобработки недревесного целлюлозосодержащего сырья [10–12]. Содержание целлюлозы в продукте щелочной делигнификации (ПЩД) повышается в 1,6 раза (86,3% против 54,0%). Этот способ позволяет эффективно удалить пентозаны: их количество снижается в 5,1 раза (4,5% против 22,8%). Остаточное содержание лигнина составило 9,0%, что в 2,3 раза ниже, чем в исходном сырье. Содержание зольных компонентов

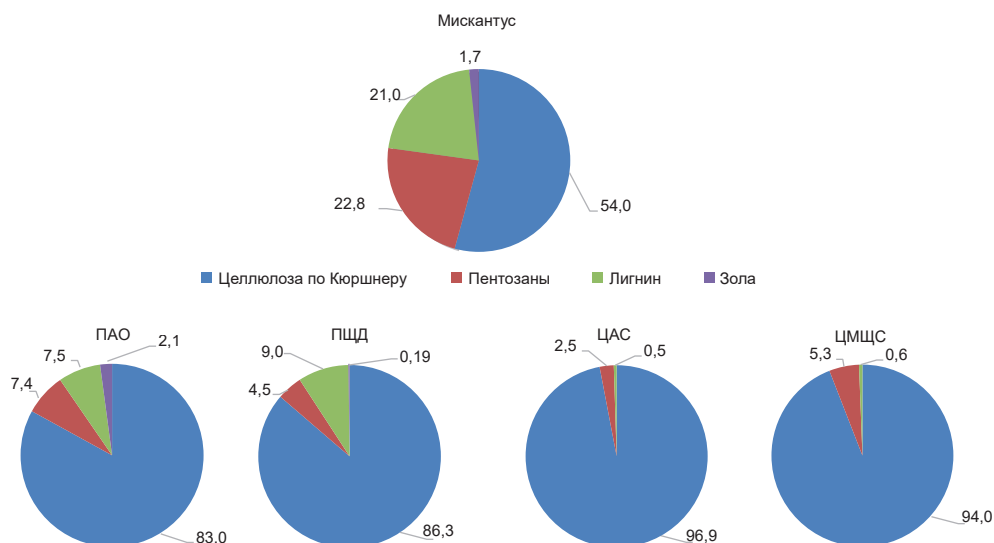


Рис. 1. Компонентный состав мискантуса гигантского и продуктов предварительной обработки

Fig. 1. Composition of *Miscanthus × giganteus* and pre-treatment products

при щелочной делигнификации снижается в 8,9 раза (0,19% против 1,7%).

Предобработка азотной кислотой на первой стадии и гидроксидом натрия на второй стадии приводит к получению химически чистого субстрата – целлюлозы, полученной азотнокислым способом (ЦАС), а именно: массовая доля целлюлозы по сравнению с сырьем увеличивается в 1,8 раза (96,9% против 54,0%), массовая доля пентозанов снижается в 8,4 раза (2,5% против 21,0%), массовая доля лигнина снижается в 42 раза (0,5% против 21,0%), зольность снижается в 17 раз (0,1% против 1,7%). Это очень эффективный способ выделения целлюлозы.

Предобработка гидроксидом натрия на первой стадии и азотной кислотой на второй стадии приводит к получению целлюлозы модифицированным щелочным способом (ЦМЩС) – субстрата с низкой зольностью и низким содержанием лигнина, но при этом сохраняется остаточное содержание пентозанов на уровне 5,3%. Это нельзя считать недостатком, если субстрат предназначен для гидролиза до РС.

Химические составы субстратов, полученные из мискантуса гигантского в ходе проведенного исследования, очень близки к химическим составам субстратов, полученных из мискантуса сахароцветного в работе [13]. Воспроизводимость результатов свидетельствует о стабильной работе используемых авторских методов предобработки недревесного целлюлозосодержащего сырья и подтверждает их эффективность. На рис. 2 представлена зависимость концентрации РС от продолжительности биокаталитического гидролиза полученных образцов.

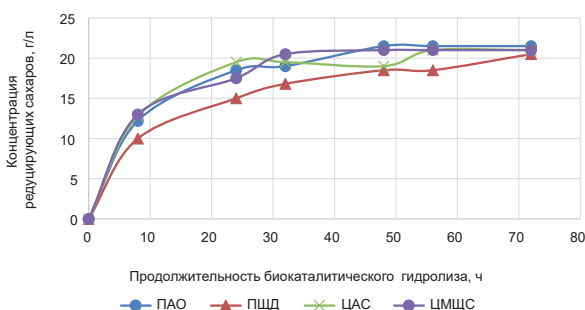


Рис. 2. Зависимость концентрации редуцирующих сахаров от продолжительности биокаталитического гидролиза

Fig. 2. Dependence of reducing sugar concentration on the duration of biocatalytic hydrolysis

Таблица 1. Ферментативный гидролиз пальпов из мискантуса гигантского

Table 1. Enzymatic hydrolysis of *Miscanthus × giganteus* pulps

Показатель	Способ предобработки мискантуса				
	ПАО	ПЩД	ЦАС	ЦМЩС	Нативный мискантус
Концентрация редуцирующих сахаров в гидролизате, г/л	21,5±0,2	20,8±0,2	21,0±0,2	21,0±0,2	0,6±0,1
Выход редуцирующих сахаров от суммы массовой доли целлюлозы и массовой доли пентозанов в субстрате, %	71,4±0,3	68,6±0,3	63,4±0,3	67,1±0,3	2,3±0,2
Концентрация ксилозы в гидролизате, г/л	2,0±0,1	1,4±0,1	0,5±0,1	1,3±0,1	0,0
Выход ксилозы от массовой доли пентозанов в субстрате, %	80,0±0,2	93,0±0,2	62,5±0,2	72,2±0,2	0,0
Вклад ксилозы в общее содержание редуцирующих сахаров, %	9,3±0,2	6,7±0,2	2,4±0,2	6,2±0,2	0,0

Выявлено, что все образцы имели схожую реакционную способность к ферментативному гидролизу. Концентрация РС через 72 ч составила 20,8–21,5 г/л. Выход РС от массы субстрата для полученных продуктов варьировался от 63,0% (для ПЩД) до 65,2% (для ПАО). Полученные данные ниже, чем данные, представленные в аналогичных исследованиях для мискантуса сахароцветкового [11].

В табл. 1 представлены обобщенные данные по выходу РС в результате ферментативного гидролиза четырех продуктов предобработки биомассы мискантуса гигантского, а также по результатам гидролиза нативной биомассы.

Все виды предобработок оказались чрезвычайно эффективными в отношении мискантуса гигантского, так как привели к повышению реакционной способности к ферментативному гидролизу гидролизующих компонентов субстратов (суммы целлюлозы и гемицеллюлоз (пентозанов)) в 28–31 раз по сравнению с нативным сырьем, а именно выход РС составил от 63,4 до 71,4% для субстратов против 2,3% для нативного мискантуса. В литературе предобработка считается успешной, если она приводит к повышению реакционной способности субстрата по сравнению с сырьем в 5 и более раз [10], таким образом, результаты примененных предобработок можно считать выдающимися.

В то же время в стремлении к научной объективности необходимо обратить внимание на чрезвычайную устойчивость к ферментативному гидролизу нативного мискантуса гигантского: выход РС составляет всего 2,3% от суммы гидролизующих компонентов, что в 7,4 раза ниже, чем гидролизующее нативного мискантуса сахароцветкового, для которого выход РС составляет 17% [13]. Данный факт можно объяснить особенностями морфологии мискантуса гигантского. Мискантус гигантский – это мощное, прочное, крепкое растение, высота которого в 2 раза превосходит высоту мискантуса сахароцветкового, а толщина стебля – в 2–3 раза больше толщины стебля указанного вида. Особенности морфологии повлияли и на поведение субстратов в процессе ферментативного гидролиза: несмотря на то, что реакционная способность к ферментативному гидролизу значительно повышается после предобработки, она для субстратов из мискантуса гигантского на 13–25% ниже, чем для субстратов из мискантуса сахароцветкового. Это очень важное обстоятельство. Полученные результаты хорошо согласуются с информацией, приведенной в источниках [18, 19], где отмечена исключительная устой-

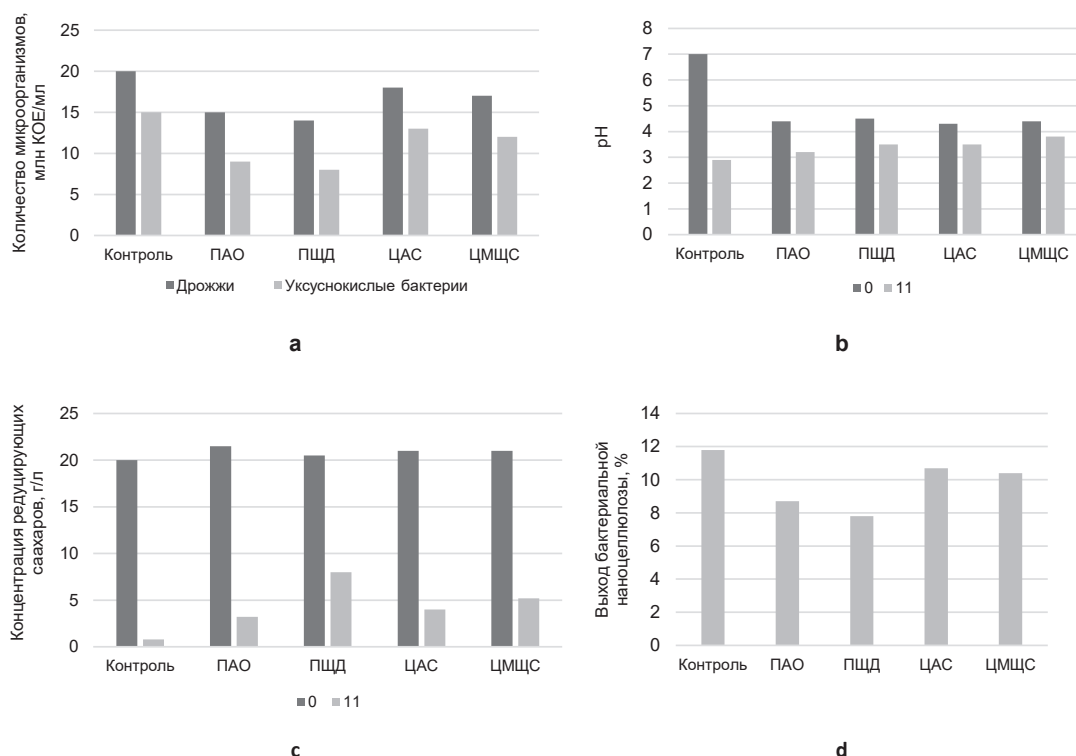


Рис. 3. Показатели биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы: а – количество дрожжей и уксуснокислых бактерий; б – pH; в – восстанавливающие сахара; г – выход бактериальной наноцеллюлозы

Fig. 3. Indicators of bacterial nanocellulose biosynthesis: а – the number of yeast and acetic acid bacteria; б – pH; в – reducing sugars; г – yield of bacterial nanocellulose

чивость мискантуса к ферментативному гидролизу, а поведение при ферментативном гидролизе не модельных, а природных субстратов объясняется в первую очередь морфологией субстрата [19].

Субстраты из мискантуса гигантского характеризуются достаточно высокой эффективностью гидролиза гемицеллюлоз. Выход ксилозы от массовой доли пентозанов в субстратах составляет от 62,5 до 93,0% (см. табл. 1). При этом вклад ксилозы в общее содержание РС составляет всего 2,4-9,3%, таким образом, получены преимущественно глюкозные гидролизаты.

На третьем этапе эксперимента проводили биосинтез БНЦ на четырех полученных гидролизатах. На рис. 3 отражены основные параметры процесса биосинтеза.

Продуцент, используемый в работе, представляет собой консорциум различных видов и родов дрожжей и уксуснокислых бактерий. Из литературных данных известно, что дрожжи синтезируют этанол для стимуляции роста количества уксуснокислых бактерий, а те в свою очередь синтезируют БНЦ для защиты дрожжей от влияния окружающей среды [20]. В связи с этим количество дрожжей превышает количество уксуснокислых бактерий. Следует отметить, что содержание дрожжей и уксуснокислых бактерий на разных питательных средах незначительно отличается между собой (см. рис. 3, а). Снижение pH в процессе культивирования (см. рис. 3, б) происходит в результате активной жизнедеятельности уксуснокислых бактерий и образования таких метаболитов, как уксусная, янтарная, глюконовая кислота и др. [21].

Это создает благоприятные условия жизнедеятельности продуцента и снижает риск контаминации посторонней микрофлорой. Остаточная концентрация РС на 11-е сутки культивирования была минимальной на синтетической питательной среде (контроль) и составила менее 1 г/л. Концентрация РС на питательных средах ферментативных гидролизатов ПАО, ЦАС и ЦМШС составила от 3,2 до 5,2 г/л. Наибольшая остаточная концентрация восстанавливающих веществ наблюдалась на среде ПШД – 8 г/л. На этой же питательной среде наблюдалось самое низкое содержание дрожжей и уксуснокислых бактерий, что объясняется негативным влиянием ионов натрия на процесс биосинтеза БНЦ [22].

Наиболее значимым показателем эффективности процессов является выход целевого продукта. Если речь идет о БНЦ, то есть два наглядных способа представления результатов: расчет выхода БНЦ в пересчете на РС и в пересчете на исходное сырье. На рисунке 3, г приведены данные по выходу БНЦ от суммы РС. Наибольшие выходы БНЦ были получены на питательных средах ферментативных гидролизатов ЦАС и ЦМШС (10,7 и 10,4% соответственно) – они сопоставимы с контролем (11,8%), для гидролизата ПАО выход был средним (8,7%), наименьший же выход БНЦ получен на среде ПШД (7,8%). В аналогичном исследовании при использовании в качестве продуцента Kombucha Original Bio выход БНЦ составил от 1 до 4%, что в 3,0–7,8 раза ниже, чем выходы БНЦ, полученные в данном исследовании [23].

Таблица 2. Расчет выхода полупродуктов и бактериальной наноцеллюлозы из мискантуса гигантского

Table 2. Calculation of the yield of semi-finished products and bacterial nanocellulose from *Miscanthus × giganteus*

Показатель	Способ предобработки мискантуса			
	ПАО	ПЩД	ЦАС	ЦМЩС
Выход пальп от массы мискантуса	50±2	48±2	32±2	38±2
Выход редуцирующих сахаров от массы субстрата, %	65,2±0,3	63,0±0,3	63,6±0,3	63,6±0,3
Выход бактериальной наноцеллюлозы от редуцирующих сахаров, %	8,7±0,1	7,8±0,1	10,7±0,1	10,4±0,1
Выход бактериальной наноцеллюлозы от массы мискантуса, %	2,84±0,05	2,36±0,05	2,18±0,05	2,51±0,05

В табл. 2 обобщены данные расчета выхода полупродуктов и БНЦ из мискантуса гигантского. Данный расчет является технологическим, поэтому для стадии ферментативного гидролиза приводится выход РС не от суммы гидролизующих компонентов, а от массы субстрата, чтобы объективно оценить, каков будет выход продукта на реальном производстве. Также приводится выход БНЦ от общих, а не от утилизированных РС, чтобы избежать математического завышения выхода. Авторы современных работ по исследованию биосинтеза БНЦ часто математически завышают выход [24, 25] в отличие от авторов классических работ, которые придерживаются реальных расчетов [26, 27].

Анализ табл. 2 показывает, что наиболее существенный вклад оказывает выход субстратов от массы мискантуса. Это ключевая стадия технологии, оказывающая наибольшее влияние на выход БНЦ в целом. На стадии ферментативного гидролиза получены примерно равные выходы РС от массы субстрата, «выпал» лишь субстрат, полученный обработкой гидроксидом натрия. Только совокупный анализ позволил определить лидера. Очевидно, что наиболее эффективной оказалась предобработка с помощью азотной кислоты, позволившая получить выход абсолютно сухой БНЦ 2,84% от массы мискантуса, что в 1,1–1,3 раза выше, чем при других способах предобработки.

В ходе проведенного исследования также определяли степень полимеризации полученных образцов БНЦ. Она составила: для синтетической питательной среды (контроль) – 2500; для ПАО – 2830, для ПЩД – 2600, для ЦАС – 3050, для ЦМЩС – 3000. Полученные значения являются близкими между собой и довольно высокими. Авторы работы [28] исследовали получение БНЦ с применением альтернативных углеродных субстратов, а именно отходов и побочных продуктов биодизельной и кондитерской промышленности (сырого глицерина, гидролизатов подсолнечного шрота, гидролизатов отходов мучных изделий). Полученные ими образцы БНЦ имели степень полимеризации в пределах 1889,1–2672,8, что ниже, чем в данной работе. При биосинтезе БНЦ на средах с использованием в качестве источника углерода различных чистых сахаров [29], что можно считать идеальными условиями, самые высокие значения степени полимеризации отмечены для сред с глюкозой и мальтозой (4350–4400), а самые низкие – для сред с маннозой (2340). Таким образом, образцы БНЦ, полученные на гидролизных средах из мискантуса гигантского, имеют вполне сопоставимые значения степени полимеризации по сравнению с образцами БНЦ, полученными как на чистых сахарных средах, так и на средах с альтернативными источниками углерода.

По сравнению с литературными данными выход БНЦ из мискантуса гигантского в 1,6–1,8 раза выше, чем выход БНЦ из мискантуса сахароцветного [14]. Так как в обоих случаях применялись идентичные методы и подходы, отличия выходов связаны с особенностями сырья. Химический состав мискантуса гигантского и мискантуса сахароцветного очень близок, но возможно, в мискантуса сахароцветном содержатся минорные компоненты, отвечающие за его зимостойкость и устойчивость к внешним факторам, и они же являются ингибиторами биосинтеза БНЦ. Известно, что продуценты БНЦ чувствительны к ингибиторам и требовательны к составу питательных сред [1, 2, 30]. Важным аспектом является воспроизводимость результатов: и в работе [14], и в данной работе максимальный выход БНЦ достигается при одностадийной предварительной обработке биомассы мискантуса с помощью азотной кислоты.

В работе [31] мискантус (вид не приводится) был подвергнут гидротермической обработке в присутствии серной кислоты, затем полученный пальп был подвергнут ферментативному гидролизу с помощью ферментного комплекса Celic CTec2 (Novozymes, Багсверд, Дания), гидролизат был стандартизован по РС (50 г/л), также были добавлены питательные соли и витамины, далее с помощью *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53524 была синтезирована БНЦ, ее продуктивность составила 16,7 г/л. Таким образом, стадия биосинтеза осуществлена с высоким выходом (37% от концентрации РС), но, к сожалению, авторы не приводят материальный баланс получения БНЦ из мискантуса, поэтому сравнить выходы не представляется возможным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования показана принципиальная возможность биосинтеза высокоценной БНЦ из доступного целлюлозосодержащего сырья – биомассы мискантуса гигантского российской селекции. Трансформация мискантуса осуществлялась в три этапа. На первом этапе проведена химическая предобработка с помощью разбавленных растворов азотной кислоты и гидроксида натрия. На второй стадии осуществлен ферментативный гидролиз полученных субстратов, на третьей стадии осуществлен биосинтез БНЦ с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12. Вторая и третья стадии проведены идентично для всех вариантов предобработки. Установлено, что нативный мискантус устойчив к ферментативному гидролизу. Выявлено, что химическая предобработка с помощью разбавленных растворов азотной кислоты и гидроксида натрия является чрезвычайно эффективной и позволяет повысить реакционную способность к ферментативному гидролизу в

28–31 раз по сравнению с нативным мискантусом. Наиболее эффективным способом предобработки мискантуса гигантского является одностадийная предварительная обработка с помощью азотной кислоты, при этом выход БНЦ от массы мискантуса

составил 2,84%. Преимуществом данной работы является осуществление полного цикла трансформации мискантуса в БНЦ, полного расчета выхода полупродуктов и целевого продукта от массы сырья.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Khan S., Ul-Islam M., Fatima A., Manan S., Khattak W.A., Ullah M.W., et al. Potential of food and agro-industrial wastes for cost-effective bacterial cellulose production: an updated review of literature // *ES Food & Agroforestry*. 2023. Vol. 13. P. 905. DOI: 10.30919/esfaf905.
2. Avcioglu N.H. Bacterial cellulose: recent progress in production and industrial applications // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022. Vol. 38. P. 86. DOI: 10.1007/s11274-022-03271-y.
3. Zhong C. Industrial-scale production and applications of bacterial cellulose // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020. Vol. 8. P. 605374. DOI: 10.3389/fbioe.2020.605374.
4. Volova T.G., Kiselev E.G., Demidenko A.V., Zhila N.O., Nemtsev I.V., Lukyanenko A.V. Production and properties of microbial polyhydroxyalkanoates synthesized from hydrolysates of Jerusalem artichoke tubers and vegetative biomass // *Polymers*. 2022. Vol. 14, no. 1. P. 132. DOI: 10.3390/polym14010132.
5. Ha D.T., Kanarskiy A.V., Kanarskaya Z.A., Scherbakov A.V., Scherbakova 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. N 3. С. 459–469. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-459-469. EDN: OMLQLP.
6. Евстафьев С.Н., Фомина Е.С., Тигунцева Н.П. Термохимическое ожигание соломы пшеницы в среде суб- и сверхкритического тетралина // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2022. Т. 12. N 1. С. 160–166. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-1-160-166. EDN: VQQNNY.
7. 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.
8. Wang C., Kong Y., Hu R., Zhou G. *Miscanthus*: a fast-growing crop for environmental remediation and biofuel production // *GCB Bioenergy: Bioproducts for a Sustainable Bioeconomy*. 2021. Vol. 13, no. 1. P. 58–69. DOI: 10.1111/gcbb.12761.
9. Banerjee S., Dien B.S., Eilts K.K., Sacks E.J., Singh V. Pilot-scale processing of *Miscanthus x giganteus* for recovery of anthocyanins integrated with production of microbial lipids and lignin-rich residue // *Chemical Engineering Journal*. 2024. Vol. 485. P. 150117. DOI: 10.1016/j.cej.2024.150117.
10. Zayed 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.
11. 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.
12. 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. P. 1–36. DOI: 10.1007/s12649-023-02219-z.
13. 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.
14. Skiba E.A., Gladysheva E.K., Golubev D.S., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Sakovich G.V. Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from *Miscanthus* biomass // *Carbohydrate Polymers*. 2021. Vol. 252. P. 117178. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117178.
15. Goh W.N., Rosma A., Kaur B., Fazilah A., Karim A.A., Rajeev B. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose // *International Food Research Journal*. 2012. Vol. 19, no. 1. P. 109–117.
16. Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the conditions for the biosynthesis of bacterial cellulose by the producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018. Vol. 54. P. 179–187. DOI: 10.1134/S0003683818020035.
17. Bogolitsyn K., Parshina A., Aleshina L. Structural features of brown algae cellulose // *Cellulose*. 2020. Vol. 27. P. 9787–9800. DOI: 10.1007/s10570-020-03485-z.
18. Van der Cruysen K., Al Hassan M., van Erven G., Dolstra O., Trindade L.M. Breeding targets to improve biomass quality in *Miscanthus* // *Molecules*. 2021. Vol. 26, no. 2. P. 254. DOI: 10.3390/molecules26020254.
19. Rohrbach J.C., Luterbacher J.S. Investigating the effects of substrate morphology and experimental conditions on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass through modeling // *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2021. Vol. 14. P. 103. DOI: 10.1186/s13068-021-01920-2.
20. Krystynowicz A., Czaja W., Wiktorowska-Jezierska A., Gonçalves-Miśkiewicz M., Turkiewicz M., Bielecki S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002. Vol. 29, no. 4. P. 189–195. DOI: 10.1038/sj.jim.7000303.
21. Yurkevich D.I., Kutysheva V.P. *Medusomyces* (tea fungus): a scientific history, composition, features of physiology and metabolism // *Biophysics*. 2002. Vol. 47, no. 6. P. 1035–1048.
22. Hong F., Qiu K. An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* ATCC 23770 // *Carbohydrate Polymers*. 2008. Vol. 72, no. 3. P. 545–549. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.09.015.
23. Amorim L.F.A., Li L., Gomes A.P., Fanguiero R., Gouveia I.C. Sustainable bacterial cellulose production by low cost feedstock: evaluation of apple and tea by-products

as alternative sources of nutrients // *Cellulose*. 2023. Vol. 30. P. 5589–5606. DOI: 10.1007/s10570-023-05238-0.

24. Han Y.-H., Mao H.-L., Wang S.-S., Deng J.-C., Chen D.-L., Li M. Ecofriendly green biosynthesis of bacterial cellulose by *Komagataeibacter xylinus* B2-1 using the shell extract of *Sapindus mukorossi* Gaertn. as culture medium // *Cellulose*. 2020. Vol. 27. P. 1255–1272. DOI: 10.1007/s10570-019-02868-1.

25. Carreira P., Mendes J.A.S., Trovatti E., Serafim L.S., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., et al. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose // *Bioresource Technology*. 2011. Vol. 102, no. 15. P. 7354–7360. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.04.081.

26. Hestrin S., Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose // *Biochemical Journal*. 1954. Vol. 58, no. 2. P. 345–352. DOI: 10.1042/bj0580345.

27. Bae S.O., Shoda M. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005. Vol. 67. P. 45–51. DOI: 10.1007/s00253-004-1723-2.

REFERENCES

1. Khan S., Ul-Islam M., Fatima A., Manan S., Khattak W.A., Ullah M.W., et al. Potential of food and agro-industrial wastes for cost-effective bacterial cellulose production: an updated review of literature. *ES Food & Agroforestry*. 2023;13:905. DOI: 10.30919/esfa905.

2. Avcioglu N.H. Bacterial cellulose: recent progress in production and industrial applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022;38:86. DOI: 10.1007/s11274-022-03271-y.

3. Zhong C. Industrial-scale production and applications of bacterial cellulose. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:605374. DOI: 10.3389/fbioe.2020.605374.

4. Volova T.G., Kiselev E.G., Demidenko A.V., Zhila N.O., Nemtsev I.V., Lukyanenko A.V. Production and properties of microbial polyhydroxyalkanoates synthesized from hydrolysates of Jerusalem artichoke tubers and vegetative biomass. *Polymers*. 2022;14(1):132. DOI: 10.3390/polym14010132.

5. Ha D.T., Kanarskiy A.V., Kanarskaya Z.A., Scherbakov A.V., Scherbakova 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.

6. Evstaf'ev S.N., Fomina E.S., Tiguntceva N.P. Thermochemical liquefaction of wheat straw in sub- and supercritical tetralin. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(1):160–166. (In Russ.). DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-1-160-166. EDN: VQQNNY.

7. 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.

8. Wang C., Kong Y., Hu R., Zhou G. *Miscanthus*: a fast-growing crop for environmental remediation and biofuel production. *GCB Bioenergy: Bioproducts for a Sustainable Bioeconomy*. 2021;13(1):58–69. DOI: 10.1111/gcbb.12761.

28. Tsouko E., Kourmentza C., Ladakis D., Kopsahelis N., Mandala I., Papanikolaou S., et al. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams // *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Vol. 16, no. 7. P. 14832–14849. DOI: 10.3390/ijms160714832.

29. Chen G., Wu G., Chen L., Wang W., Hong F.F., Jönsson L.J. Comparison of productivity and quality of bacterial nanocellulose synthesized using culture media based on seven sugars from biomass // *Microbial Biotechnology*. 2019. Vol. 12, no. 4. P. 677–687. DOI: 10.1111/1751-7915.13401.

30. Revin V.V., Liyaskina E.V., Parchaykina M.V., Kuzmenko T.P., Kurgaeva I.V., Revin V.D., et al. Bacterial cellulose-based polymer nanocomposites: a review // *Polymers*. 2022. Vol. 14, no. 21. P. 4670. DOI: 10.3390/polym14214670.

31. Kim H., Son J., Lee J., Yoo H.Y., Lee T., Jang M., et al. Improved production of bacterial cellulose through investigation of effects of inhibitory compounds from lignocellulosic hydrolysates // *GCB Bioenergy: Bioproducts for a Sustainable Bioeconomy*. 2021. Vol. 13, no. 3. P. 436–444. DOI: 10.1111/gcbb.12800.

9. Banerjee S., Dien B.S., Eilts K.K., Sacks E.J., Singh V. Pilot-scale processing of *Miscanthus x giganteus* for recovery of anthocyanins integrated with production of microbial lipids and lignin-rich residue. *Chemical Engineering Journal*. 2024;485:150117. DOI: 10.1016/j.cej.2024.150117.

10. 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.

11. 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.

12. 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;15:1–36. DOI: 10.1007/s12649-023-02219-z.

13. 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.

14. Skiba E.A., Gladysheva E.K., Golubev D.S., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Sakovich G.V. Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from *Miscanthus* biomass. *Carbohydrate Polymers*. 2021;252:117178. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117178.

15. Goh W.N., Rosma A., Kaur B., Fazilah A., Karim A.A., Rajeev B. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *International Food Research Journal*. 2012;19(1):109–117.

16. Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the conditions for the biosynthesis of bacterial cellulose by the producer *Medusomyces*

gisevii Sa-12. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018;54:179-187. DOI: 10.1134/S0003683818020035.

17. Bogolitsyn K., Parshina A., Aleshina L. Structural features of brown algae cellulose. *Cellulose*. 2020;27:9787-9800. DOI: 10.1007/s10570-020-03485-z.

18. Van der Cruysen K., Al Hassan M., van Erven G., Dolstra O., Trindade L.M. Breeding targets to improve biomass quality in *Miscanthus*. *Molecules*. 2021;26(2):254. DOI: 10.3390/molecules26020254.

19. Rohrbach J.C., Luterbacher J.S. Investigating the effects of substrate morphology and experimental conditions on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass through modeling. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2021;14:103. DOI: 10.1186/s13068-021-01920-2.

20. Krystynowicz A., Czaja W., Wiktorowska-Jezińska A., Gonçalves-Miśkiewicz M., Turkiewicz M., Bielecki S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002;29(4):189-195. DOI: 10.1038/sj.jim.7000303.

21. Yurkevich D.I., Kutyshechenko V.P. Medusomyces (tea fungus): a scientific history, composition, features of physiology and metabolism. *Biophysics*. 2002;47(6):1035-1048.

22. Hong F., Qiu K. An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* ATCC 23770. *Carbohydrate Polymers*. 2008;72(3):545-549. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.09.015.

23. Amorim L.F.A., Li L., Gomes A.P., Fangueiro R., Gouveia I.C. Sustainable bacterial cellulose production by low cost feedstock: evaluation of apple and tea by-products as alternative sources of nutrients. *Cellulose*. 2023;30:5589-5606. DOI: 10.1007/s10570-023-05238-0.

24. Han Y.-H., Mao H.-L., Wang S.-S., Deng J.-C., Chen D.-L., Li M. Ecofriendly green biosynthesis of bacterial cellulose by *Komagataeibacter xylinus* B2-1 using the

shell extract of *Sapindus mukorossi* Gaertn. as culture medium. *Cellulose*. 2020;27:1255-1272. DOI: 10.1007/s10570-019-02868-1.

25. Carreira P., Mendes J.A.S., Trovatti E., Serafim L.S., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., et al. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource Technology*. 2011;102(15):7354-7360. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.04.081.

26. Hestrin S., Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*. 1954;58(2):345-352. DOI: 10.1042/bj0580345.

27. Bae S.O., Shoda M. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;67:45-51. DOI: 10.1007/s00253-004-1723-2.

28. Tsouko E., Kourmentza C., Ladakis D., Kopsahelis N., Mandala I., Papanikolaou S., et al. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(7):14832-14849. DOI: 10.3390/ijms160714832.

29. Chen G., Wu G., Chen L., Wang W., Hong F.F., Jönsson L.J. Comparison of productivity and quality of bacterial nanocellulose synthesized using culture media based on seven sugars from biomass. *Microbial Biotechnology*. 2019;12(4):677-687. DOI: 10.1111/1751-7915.13401.

30. Revin V.V., Liyaskina E.V., Parchaykina M.V., Kuzmenko T.P., Kurgaeva I.V., Revin V.D., et al. Bacterial cellulose-based polymer nanocomposites: a review. *Polymers*. 2022;14(21):4670. DOI: 10.3390/polym14214670.

31. Kim H., Son J., Lee J., Yoo H.Y., Lee T., Jang M., et al. Improved production of bacterial cellulose through investigation of effects of inhibitory compounds from lignocellulosic hydrolysates. *GCB Bioenergy: Bioproducts for a Sustainable Bioeconomy*. 2021;13(3):436-444. DOI: 10.1111/gcbb.12800.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Шавыркина Надежда Александровна,

к.т.н., доцент,
старший научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
доцент,
Бийский технологический институт (филиал) Алтай-
ского государственного технического
университета им. И.И. Ползунова,
659305, г. Бийск, ул. Героя Советского Союза
Трофимова, 27, Российская Федерация,
32nadina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5572-1476>

Гладышева Евгения Константиновна,

к.т.н., научный сотрудник,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
evg-gladysheva@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6567-9662>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nadezhda A. Shavyrkina,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Senior Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 6592322,
Russian Federation,
Associate Professor,
Biysk Technological Institute,
Polzunov Altai State Technical University,
27, Hero of the Soviet Union Trofimov St.,
Biysk, 659305, Russian Federation,
32nadina@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5572-1476>

Evgeniya K. Gladysheva,

Cand. Sci. (Engineering), Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 6592322,
Russian Federation,
evg-gladysheva@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6567-9662>

Зенкова Анастасия Александровна,
инженер-исследователь,
Институт проблем химико-энергетических
технологий СО РАН,
659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, 1,
Российская Федерация,
магистрант,
Бийский технологический институт (филиал) Алтай-
ского государственного технического
университета им. И.И. Ползунова,
659305, г. Бийск, ул. Героя Советского Союза
Трофимова, 27, Российская Федерация,
zenkova_nastasya080401@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-0868-5444>

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>

Вклад авторов

Н.А. Шавыркина – разработка концепции
исследования, обработка полученных данных,
обсуждение результатов, написание
текста статьи.
Е.К. Гладышева – проведение экспериментов,
обработка полученных данных, подготовка
иллюстративного материала.
А.А. Зенкова – проведение экспериментов.
Е.А. Скиба – разработка концепции
исследования, обработка полученных
данных, осуществление расчетов,
обсуждение результатов, валидация.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 02.09.2024.
Одобрена после рецензирования 15.11.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

Anastasia A. Zenkova,
Research Engineer,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 6592322,
Russian Federation,
Student of the Master's Program,
Biysk Technological Institute,
Polzunov Altai State Technical University,
27, Hero of the Soviet Union Trofimov St.,
Biysk, 659305, Russian Federation,
zenkova_nastasya080401@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-0868-5444>

Ekaterina A. Skiba,
Dr. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Leading Researcher,
Institute for Problems of Chemical
and Energetic Technologies SB RAS,
1, Sotsialisticheskaya St., Biysk, 6592322,
Russian Federation,
✉ eas08988@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8897-347X>

Contribution of the authors

Nadezhda A. Shavyrkina – research concept
development, data processing, results discussion,
writing the text of manuscript.
Evgeniya K. Gladysheva – conducting
experiments, data processing, visualization.
Anastasia A. Zenkova – conducting experiments.
Ekaterina A. Skiba – research concept
development, data processing, calculations,
results discussion, validation.

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 02.09.2024.
Approved after reviewing 15.11.2024.
Accepted for publication 30.11.2024.



Влияние повышенной экспрессии гена митохондриальной альтернативной внешней NADH-дегидрогеназы *Arabidopsis thaliana* на уровень генерации активных форм кислорода в листьях табака *Nicotiana tabacum* при низкой температуре

Г.Б. Боровский, Е.Л. Горбылева, А.И. Катышев, Н.Е. Коротаева,
Е.А. Полякова, Д.В. Пятрикас, А.В. Степанов, И.В. Федосеева✉, А.М. Шигарова

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

Аннотация. Низкая температура является одним из важных факторов, лимитирующих жизнеспособность и продуктивность растений. При многих стрессах, в том числе и при низкой температуре, в клетке происходит увеличение генерации активных форм кислорода, которые являются сигнальными молекулами и в то же время вредят клетке, повреждая ее компоненты. В свою очередь, митохондрии представляют собой одну из основных мишеней окислительного повреждения при стрессе, а кроме того, значительный источник активных форм кислорода. Митохондрии растений имеют большое количество ферментов альтернативных путей транспорта электронов, многие из которых активны при стрессе. Цель проведенного исследования заключалась в оценке влияния низкой положительной температуры и повышенной экспрессии гетерологичного гена NDB2 (альтернативная внешняя NADH-дегидрогеназа митохондрий) на генерацию активных форм кислорода, работу альтернативной дыхательной цепи в митохондриях и экспрессию стрессовых белков в условиях освещения в листьях табака *Nicotiana tabacum*. Установлено, что в листьях растений табака с повышенной экспрессией гена NDB2 *Arabidopsis thaliana* происходило снижение продукции активных форм кислорода в контрольных условиях и в условиях пониженной температуры в сравнении с растениями дикого типа. Полученные результаты свидетельствуют, что гетерологичный ген NDB2 *Arabidopsis thaliana* участвует в увеличении активности альтернативной электрон-транспортной цепи в митохондриях растений табака, снижает уровень генерации активных форм кислорода и влияет на содержание стрессовых белков как в контрольных условиях, так и в условиях низкотемпературного воздействия.

Ключевые слова: табак, активные формы кислорода, низкая температура, альтернативная внешняя NADH-дегидрогеназа, NDB2, митохондрии

Благодарности. Для выполнения работы было использовано оборудование Центра коллективного пользования «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00097 (<https://rscf.ru/project/23-24-00097/>).

Для цитирования: Боровский Г.Б., Горбылева Е.Л., Катышев А.И., Коротаева Н.Е., Полякова Е.А., Пятрикас Д.В. [и др.]. Влияние повышенной экспрессии гена митохондриальной альтернативной внешней NADH-дегидрогеназы *Arabidopsis thaliana* на уровень генерации активных форм кислорода в листьях табака *Nicotiana tabacum* при низкой температуре // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 514–524. DOI: 10.21285/achb.943. EDN: XNVAAG.

Effect of increased gene expression of alternative external NADH dehydrogenase of mitochondria of *Arabidopsis thaliana* on the generation of reactive oxygen in *Nicotiana tabacum* tobacco leaves at low temperatures

Gennadii B. Borovskii, Elena L. Gorbyleva, Alexander I. Katyshev,
Natalia E. Korotaeva, Elizaveta A. Polyakova, Darya V. Pyatrikas,
Alexey V. Stepanov, Irina V. Fedoseeva✉, Anastasiya M. Shigarova

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

Abstract. Low temperature is an important factor limiting plant viability and productivity. Along with other stresses, low temperatures increase the generation of reactive oxygen species, which are signaling molecules that can damage cell components. As well as representing one of the main targets of oxidative damage during stress, mitochondria represent a significant source of reactive oxygen species. Plant mitochondria have a large number of enzymes providing alternative electron transport pathways, many of which are activated under stress. Our aim was to assess the effect of low positive temperatures and increased expression of the heterologous gene NDB2 (alternative external NADH dehydrogenase of mitochondria) on the generation of reactive oxygen species, which involve an alternative respiratory chain in mitochondria and the expression of stress proteins under lighting conditions in *Nicotiana tabacum* tobacco leaves. In the leaves of tobacco plants with increased expression of the *Arabidopsis thaliana* NDB2 (AtNDB2) gene, a decrease in reactive oxygen species production was observed under normal and low temperature conditions. The results indicate that the heterologous *Arabidopsis thaliana* NDB2 gene is involved in increasing the activity of the alternative electron transport chain in mitochondria, which reduces the level of reactive oxygen species generation and affects the content of stress proteins under normal and low-temperature exposure.

Keywords: tobacco, reactive oxygen species, low temperature, alternative outer NADH-dehydrogenase, NDB2, mitochondria

Acknowledgements. The equipment of the Center for Collective Use “Bioanalitika” of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (Irkutsk) was used in the work.

Funding. Russian Science Foundation, project no. 23-24-00097 (<https://rscf.ru/project/23-24-00097/>), supported the work.

For citation: Borovskii G.B., Gorbyleva E.L., Katyshev A.I., Korotaeva N.E., Polyakova A.V., Pyatrikas D.V., et al. Effect of increased gene expression of alternative external NADH dehydrogenase of mitochondria of *Arabidopsis thaliana* on the generation of reactive oxygen in *Nicotiana tabacum* tobacco leaves at low temperatures. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):514-524. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.943. EDN: XNVAAG.

ВВЕДЕНИЕ

Растения периодически подвергаются различным неблагоприятным воздействиям, часть из которых приводит к стрессу. При многих стрессах в клетке происходит увеличение генерации активных форм кислорода (АФК), которые являются сигнальными молекулами и в то же время вредят клетке, повреждают ее компоненты [1]. Митохондрии являются мишенью окислительного повреждения при стрессе. Это важный источник АФК, а кроме того, регуляторный узел клеточного метаболизма [2, 3]. В митохондриях клеток растений и животных основными сайтами генерации АФК являются комплексы I и III дыхательной цепи. При этом перевосстановление электрон-транспортной цепи митохондрий приводит к существенному росту генерации АФК [4].

Митохондрии растений имеют большое количество ферментов альтернативных путей транспорта электронов, многие из которых активны при стрессе [5]. У *Arabidopsis thaliana* эти ферменты кодируют 7 генов NAD(P)H-дегидрогеназ типа II (NDII: NDB1–4, NDA1–2, NDC1) и 5 генов альтернативной оксидазы (AOX1a–d, AOX2) [6]. Наиболее изученными по их функциональной роли и активности при стрессе являются ген AOX1a и кодируемый им фермент альтернативная оксидаза. Функционирование AOX препятствует неконтролируемому увеличению количества АФК при угнетении дыхательной цепи в условиях стресса или перевосстановления пула убихинонов. Кроме того, AOX регулирует метаболизм и экспрессию многих генов в условиях стресса [7, 8]. Работа и функции альтернативных NAD(P)

Н-дегидрогеназ в стрессовых условиях исследованы недостаточно. В случае переключения митохондрий на альтернативную активность NAD(P)H окисляется несколькими ферментами, локализованными на внутренней митохондриальной мембране. Установлена локализация данных ферментов: NDB1–NDB4 являются внешними (расположены на наружной стороне внутренней мембраны митохондрий), а NDA1–NDA2 и NDC1 – внутренними (обращены к митохондриальному матриксу) [9]. Оказалось, что экспрессия кодирующих их генов увеличивается в условиях стресса скоординированным образом с генами, кодирующими AOX [10, 11]. При одновременной работе внешней и (или) внутренней NDH и альтернативной оксидазы клетка свободно окисляет часть NAD(P)H, превращая химическую энергию в тепловую, что позволяет регулировать окислительно-восстановительное состояние пула NAD(P)H и компонентов электрон-транспортной цепи митохондрий в клетке растений и «обходить» сайты генерации АФК в митохондриях. Такое дыхание, которое называют несопряженным или «свободным», вовлечено во многие процессы, связанные с необходимостью ограничивать избыточную генерацию АФК в растениях [12].

При многих видах стресса, например засухе, практически все гены, кодирующие белки альтернативных путей митохондриального транспорта электронов, участвуют в стрессовой реакции растений и адаптации [13]. Было показано, что активность гена *NDB2* играет роль в устойчивости арабидопсиса к засухе при избыточном освещении [14], а устойчивый к засухе сорт сои демонстрировал значительно более высокую экспрессию *NDB2* (как и ряда других генов альтернативных путей дыхания), нежели чувствительные к данному стрессовому фактору растения [15]. В то же время прямых экспериментов, указывающих на роль *NDB2* в условиях пониженной температуры, ранее проведено не было.

В качестве модельного объекта данного исследования были использованы растения табака дикого типа (wt) (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1) и растения с повышенной экспрессией гена *A. thaliana NDB2* (линия 13S), полученные нами в результате предыдущих исследований [16].

Ранее нами было показано, что ингибирование дыхания ротеноном в листьях табака с повышенной экспрессией гена *AtNDB2* было существенно ниже, чем в листьях растений дикого типа, что подтверждало высокую функциональную активность белка NDB2 в линии 13S [17]. Дыхательная активность изолированных митохондрий из линии 13S была выше при использовании малата, сукцината и NADH (но не NADPH) в качестве субстрата дыхания. Скорость поглощения кислорода митохондриями при блокировании цитохромного пути дыхания также была значительно выше, чем у митохондрий из растений табака дикого типа [17]. В целом особенности митохондриального дыхания и результаты ингибиторного анализа позволили предположить увеличение экспрессии и активности AOX, наружной и внутренней NADH-дегидрогеназы типа II в растениях с повышенной экспрессией гена *AtNDB2*. Таким образом, полученные результаты подтвердили высокую активность белка NDB2 и формирование альтернативной нефосфорилирующей дыхательной цепи в митохондриях в растениях с повышенной экспрессией гена *AtNDB2*,

при этом устойчивость растений линии 13S в условиях пониженных температур не повышалась в сравнении с растениями дикого типа [17].

В описанных выше экспериментах не определяли уровень генерации АФК в условиях низкотемпературного стресса и комфортной температуре. Между тем рост генерации АФК является для теплолюбивых растений в условиях пониженных температур как важным звеном сигналинга, так и существенным повреждающим фактором. Цель исследования заключалась в оценке влияния низкой положительной температуры и повышенной экспрессии гетерологичного гена *NDB2* (альтернативная внешняя NADH-дегидрогеназа митохондрий) на генерацию АФК, работу альтернативной дыхательной цепи в митохондриях и экспрессию стрессовых белков в условиях освещения в листьях *Nicotiana tabacum*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Определение уровня генерации АФК в листьях табака с повышенной экспрессией гена *AtNDB2* в сравнении с диким типом проводили по содержанию пероксида водорода. Растения табака выращивали в почвосмеси в климатической камере (Binder, Германия) при освещении 140 мкМ/(м²×с), фотопериоде 16/8 день/ночь и температуре 25 °С до возраста 6 недель с момента укоренения в почве. Использовали 3 биологические повторности по 4–5 растений для линии 13S и для растений дикого типа. Воздействие пониженной температурой 10 °С проводили в тех же условиях освещения в течение 7 суток. Листья для определения уровня генерации АФК и уровня экспрессии стрессовых белков отбирали непосредственно перед началом низкотемпературного воздействия, а также после 1 и 7 суток действия температуры 10 °С.

Определение содержания H₂O₂ в листьях проводили по методу, описанному в источнике [18], в нашей модификации. Растительную ткань (250 мг) замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в ступке при 4 °С с буфером, содержащим 0,1% трихлоруксусной кислоты (рН 7,5) в объеме 2,5 мл. Гомогенат центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при 4 °С. Для определения содержания H₂O₂ использовали супернатант в объеме 100 мкл, добавляли 400 мкл 0,1%-й трихлоруксусной кислоты, 500 мкл реагента (0,5 мМ FeSO₄·(NH₄)₂SO₄·6H₂O, 0,5% (v/v) H₂SO₄, 200 мкМ ксиленолового оранжевого (AppliChem, Германия)), 200 мМ сорбитола (Gerbu, Германия). Смесь встряхивали на вортексе и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Определяли поглощение конечного продукта спектрофотометрически (SmartSpec Plus, Bio-Rad, США) при длине волны 560 нм. Концентрацию H₂O₂ рассчитывали по калибровочной кривой и выражали в мкМ/г сырого веса. Контрольная кювета содержала 500 мкл 0,1%-й трихлоруксусной кислоты и 500 мл реагента.

Полученные результаты показали, что в контрольных условиях (25 °С) уровень содержания АФК в листьях растений с повышенной экспрессией гена *AtNDB2* (13S) был ниже в сравнении с диким типом (wt), увеличивался в условиях пониженной температуры (10 °С) у обоих типов растений, но оставался значимо ниже в листьях растений линии 13S (рис. 1). При этом сни-

жение уровня продукции АФК сохранялось в течение длительного времени (до 7 суток) действия пониженной температуры.

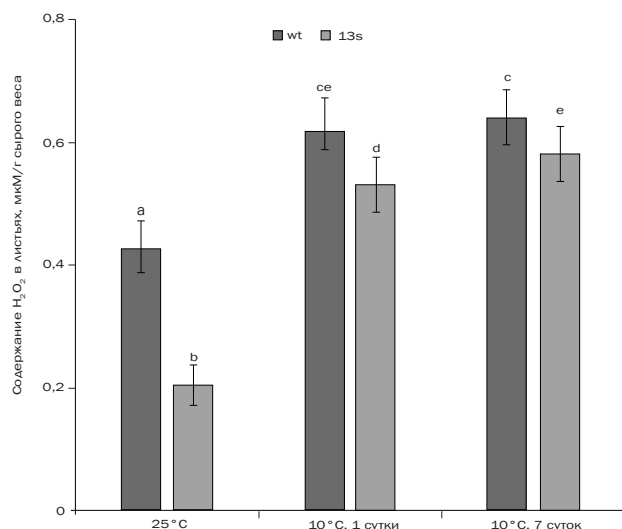


Рис. 1. Изменение содержания пероксида водорода в листьях табака дикого типа (wt) и линии 13S в условиях пониженной температуры 10 °C в течение 1 и 7 суток. Разные буквенные обозначения показывают значимую разницу между средними ($M \pm SD$, $n = 4$. ANOVA Fisher LSD method, $P < 0,05$)

Fig. 1. Changes in hydrogen peroxide content in the leaves of wild-type (wt) and 13S tobacco line under low temperature conditions of 10 °C for one and seven days. Different letter designations indicate a significant difference between the means ($M \pm SD$, $n = 4$. ANOVA Fisher LSD method, $P < 0.05$)

Содержание стрессовых белков в экспериментальных растениях анализировали с использованием электрофореза и иммуноблоттинга, как описано ранее [17]. Листья замораживали в жидком азоте и растирали с кварцевым песком в 2,5 мл буфера, содержащего 100 mM Трис-HCl (pH 7,4), 0,1% додецилсульфата натрия, 12 mM β -меркаптоэтанола, 0,5 mM фенилметилсульфонилфторида и 50 мг нерастворимого поливинилпирролидона. После центрифугирования (18000 g, 10 мин) белок из супернатанта осаждали пятикратным объемом охлажденного до минус 20 °C ацетона (8500 g, 10 мин). Полученный осадок растворяли в буфере для образца, и определяли содержание белка с реактивом Брэдфорда (Bio-Rad, США). По 10–30 мкг белка из каждой пробы разделяли электрофоретически в 12%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и переносили на нитроцеллюлозную мембрану в системе miniProtein III (BioRad, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Для идентификации белков использовали первичные антитела против HSP70, HSP17,6 и HSP101 (Agrisera, Швеция) и вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой (Sigma, США). Визуализацию антител проводили с использованием хромогенов BCIP (5-bromo-6-chloro-3-indolylphosphate-toluidine salt, Gerbu, Германия) и NBT (nitrotetrazolium blue chloride, AppliChem, Германия).

Полученные результаты показали, что содержание HSP101 в листьях растений дикого типа в условиях

комфортной температуры 25 °C было выше, чем у растений линии 13S (рис. 2). Спустя 1 сутки воздействия пониженной температурой 10 °C содержание HSP101 возрастало в листьях растений с повышенной экспрессией гена *AtNDB2*, а после 7 суток низкотемпературного стресса этот белок практически не регистрировался (см. рис. 2).

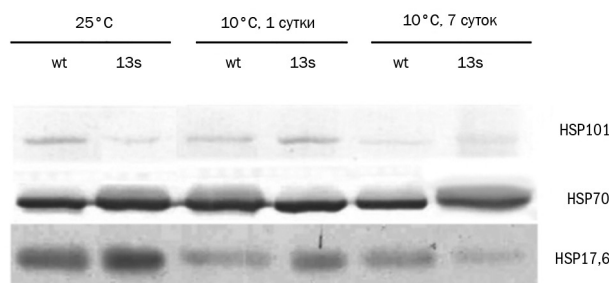


Рис. 2. Влияние комфортной (25 °C) и пониженной (10 °C, 1 и 7 суток) температуры на содержание стрессовых белков в листьях растений дикого типа (wt) и растений с повышенной экспрессией гена *AtNDB2* (13S). Приведены фотографии типичных иммуноблотов

Fig. 2. Effect of comfortable (25 °C) and low (10 °C, 1 and 7 days) temperature on the content of stress proteins in the leaves of wild-type plants (wt) and plants with increased expression of the *AtNDB2* (13S) gene. Photographs of typical immunoblots are shown

Содержание HSP70 во всех пробах было примерно одинаковым (см. рис. 2). HSP17,6 было больше в листьях линии 13S, за исключением пробы, отобранной после 7 суток инкубации в условиях пониженной температуры 10 °C. Полученные результаты показывают, что более высокий уровень HSP101 после 1 суток в условиях действия температуры 10 °C находится в обратной зависимости с уровнем содержания пероксида в листьях растений табака дикого типа и линии 13S (см. рис. 1), однако прямой корреляции между уровнем содержания пероксида водорода и количеством этого и других стрессовых белков не обнаружено.

Предварительный анализ изменений экспрессии стрессовых генов показал, что снижение количества белков теплового шока HSP101 и низкомолекулярных белков теплового шока сопровождалось снижением количества транскриптов соответствующих генов (Nitab4.5_0001485g0200 – ортолог *hsp101*, Nitab4.5_0000312g0130 – ортолог *hsp23.6*, Nitab4.5_0000286g0060 – ортолог *hsp17.6A*). Экспрессия генов-ортологов *hsp70* (Nitab4.5_0002290g0030, Nitab4.5_0001579g0060, Nitab4.5_0005771g0020), кодирующих белки HSP70 различной клеточной локализации, изменялась в меньшей степени; при этом общей наблюдаемой тенденцией для всех генов, кодирующих стрессовые белки, являлось снижение количества матричных рибонуклеиновых кислот в листьях растений дикого типа в условиях продолжительного холодового воздействия 10 °C в течение 7 суток (данные по изменению экспрессии не представлены). Полученные предварительные данные об изменении количества матричных рибонуклеиновых кислот, кодирующих стрессовые белки, в целом соответствовали наблюдаемому нами содержанию белков HSP в листьях (см. рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты (см. рис. 1) показывают, что генерация АФК в листьях растений табака с увеличенной экспрессией *AtNDB2* ниже в сравнении с диким типом как в комфортных условиях, так и в условиях пониженной температуры. В листьях наиболее важным источником АФК в стрессовых условиях являются хлоропласты [1]. Для фотоавтотрофных клеток растений необходимо поддержание равновесия между энергией, улавливаемой фотохимическими реакциями, и энергией, используемой в ходе метаболизма, роста и развития. В условиях низкой температуры скорость переноса электронов может быть избыточной по сравнению со скоростью ферментативных реакций цикла Кальвина. Возникающий дисбаланс между поступающей и используемой энергией приводит к перевосстановленному состоянию компонентов фотосистем и росту генерации АФК в фотосинтезирующих клетках [19, 20]. Такая ситуация может привести к повреждению хлоропластов и других частей клеток и, в свою очередь, требует участия митохондрий и путей альтернативного электронного транспорта в поддержании упомянутого выше равновесия [1, 12, 21, 22].

Восстановленные эквиваленты из хлоропластов передаются в митохондрии с участием малат-оксалоацетатного шаттла. Так, в работе [23] установлено, что у мутантов по гену *AOX1a* падает активность ключевых ферментов малат-оксалоацетатного шаттла и растёт отношение $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ в строме. В более поздней работе [24] были зафиксированы синхронные изменения в активности малат-оксалоацетатного шаттла и активности АОХ с увеличением интенсивности света как в комфортных условиях, так и в условиях действия пониженной температуры, причем одновременно с этим были зафиксированы рост генерации АФК и ингибирование фотосинтеза. Данные факты указывают как на существенную роль альтернативного пути дыхания в митохондриях в процессе фотосинтеза, так и на участие в качестве связующего звена между хлоропластами и митохондриями малат-оксалоацетатного шаттла. В литературе описаны и другие результаты, указывающие на то, что активность АОХ способна защищать фотосинтетический аппарат от фотоингибирования в стрессовых условиях [8, 22, 25]. Эти данные позволили предположить, что экспрессия генов *NDB* и *AOX* у растений взаимосвязана. Так, уровень экспрессии *AOX1a* у *A. thaliana* определяет уровень экспрессии гена *AtNDB2* в контроле и в условиях повышенного ультрафиолетового облучения [26]. Экспрессия этих генов происходит синхронно в ответ на различные абиотические стрессы, что предполагает совместную регуляцию общими промоторными элементами. В трансгенных растениях табака *N. sylvestris* с гиперэкспрессией гена *StNDB1* картофеля (*Solanum tuberosum* L.) наблюдали повышение активности собственного гена АОХ табака [27]. Экспрессия генов другой «внутренней» альтернативной NADH -дегидрогеназы *NDA* оказалась связана с успешным прохождением стресса, сохранением фотосинтетической системы и уменьшением генерации АФК [28]. Схожий эффект активации экспрессии разных генов альтернативных электрон-транспортных цепей митохондрий при высокой экспрессии *NDB2* наблюдала в растениях табака и наша группа [29], что подтверждает предпо-

ложение о взаимной корреляции уровня экспрессии всех генов альтернативных цепей митохондриального электронного транспорта. Одним из возможных путей, объединяющих экспрессию генов альтернативной электрон-транспортной цепи, является ретроградный сигналинг, при котором редокс-сигналы митохондриальной цепи индуцируют экспрессию АОХ, *NDA2*, *NDB2* и *UCP1b* вместе с генами антиоксидантных систем [8].

Координированная экспрессия генов *NDB* (и/или *NDA*) и АОХ, а также совместная работа кодируемых ими белков обеспечивает функционирование несопряженного дыхания, ограничивающего избыточную генерацию АФК в растениях [12]. В исследованных нами растениях табака с повышенной экспрессией *AtNDB2* наблюдалась активация дыхания через альтернативные пути электронного транспорта: NDB2-Q/QH2-AOX при использовании NADH в качестве субстрата дыхания; NDA-Q/QH2-AOX с использованием малата в качестве субстрата дыхания [17]. Вероятно, это повышение скорости альтернативного дыхания и определяет снижение уровня АФК в листьях трансгенных растений: с помощью передачи избыточных восстановленных эквивалентов из хлоропластов в митохондрии, а далее через путь, использующий альтернативную дыхательную цепь митохондрий.

Увеличенная генерация АФК и других повреждающих факторов в условиях стресса может приводить к синтезу стрессовых белков, которые являются и маркерами стресса, и частью защитных систем клеток [30, 31]. Экспрессия гетерологичного гена *AtNDB2* не вызывала повышения содержания H_2O_2 (см. рис. 1) и стрессового белка *HSP101* в условиях комфортной температуры $25\text{ }^\circ\text{C}$ в листьях табака линии 13S (см. рис. 2). Низкотемпературный стресс $10\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 1 суток приводил к увеличению содержания пероксида водорода в листьях табака как дикого типа, так и линии 13S (см. рис. 1). В растениях с повышенной экспрессией гена *AtNDB2* повышение содержания H_2O_2 происходило в меньшей степени в сравнении с растениями дикого типа (см. рис. 1), при этом содержание *HSP101* увеличивалось (см. рис. 2). *HSP101* – один из главных шаперонов, который выполняет важнейшую функцию извлечения функциональных белков из агрегированного состояния, а также играет ключевую роль в развитии термотолерантности растений [32] и при реакции на другие стрессы [33]. Как и другие белки теплового шока, *HSP101* участвует в защите трансляционного аппарата клетки при стрессе [34]. Помимо этого, белки теплового шока участвуют в правильной укладке вновь синтезированных белков и корректной адресации их в хлоропласты [35–38]. Таким образом, наблюдаемое в нашей работе общее снижение экспрессии низкомолекулярных белков теплового шока и *HSP101* при продолжительном действии пониженной температуры свидетельствует о более выраженном, чем у холодостойких растений, подавлении трансляции белков у теплолюбивого растения табака и вероятном снижении активности фотосинтеза. По-видимому, эти изменения клеточного метаболизма определяют наблюдаемый нами не изменяющийся уровень генерации АФК в листьях в условиях продолжительного воздействия пониженной температуры $10\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 7 суток (см. рис. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты и рассмотренные литературные данные свидетельствуют о том, что в листьях табака активность гетерологичного гена *AtNDB2* и аль-

тернативной электрон-транспортной цепи митохондрий способна снизить уровень генерации АФК при низкотемпературном воздействии и влияет на содержание стрессовых белков.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. García-Caparrós P., De Filippis L., Gul A., Hasanuzzaman M., Ozturk M., Altay V., et al. Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review // *The Botanical Review*. 2020. Vol. 87. P. 421–466. DOI: 10.1007/s12229-020-09231-1.
2. Bartoli C.G., Gómez F., Martínez D.E., Guamet J.J. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Journal of Experimental Botany*. 2004. Vol. 55, no. 403. P. 1663–1669. DOI: 10.1093/jxb/erh199.
3. Liberatore K.L., Dukowic-Schulze S., Miller M.E., Chen C., Kianian S.F. The role of mitochondria in plant development and stress tolerance // *Free Radical Biology and Medicine*. 2016. Vol. 100. P. 238–256. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.033.
4. Sachdev S., Ansari S.A., Ansari M.I., Fujita M., Hasanuzzaman M. Abiotic stress and reactive oxygen species: generation, signaling, and defense mechanisms // *Antioxidants*. 2021. Vol. 10, no. 2. P. 277. DOI: 10.3390/antiox10020277.
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/tj.15495.
6. Bailey C.D., Carr T.G., Harris S.A., Hughes C.E. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2003. Vol. 29, no. 3. P. 435–455. DOI: 10.1016/j.ympev.2003.08.021.
7. Saha B., Borovskii G., Panda S.K. Alternative oxidase and plant stress tolerance // *Plant Signaling & Behavior*. 2016. Vol. 11, no. 12. DOI: 10.1080/15592324.2016.1256530.
8. Garmash E.V. Role of mitochondrial alternative oxidase in the regulation of cellular homeostasis during development of photosynthetic function in greening leaves // *Plant Biology*. 2021. Vol. 23, no. 2. P. 221–228. DOI: 10.1111/plb.13217.
9. Elhafez D., Murcha M.W., Clifton R., Soole K.L., Day D.A., Whelan J. Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis*: intraorganelle location and expression // *Plant & Cell Physiology*. 2006. Vol. 47, no. 1. P. 43–54. DOI: 10.1093/pcp/pci221.
10. Clifton R., Lister R., Parker K.L., Sappl P.G., Elhafez D., Millar A.H., et al. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Molecular Biology*. 2005. Vol. 58. P. 193–212. DOI: 10.1007/s11103-005-5514-7.
11. Wanniarachchi V.R., Dametto L., Sweetman C., Shavrukov Y., Day D.A., et al. Alternative respiratory pathway component genes (*AOX* and *ND*) in rice and barley and their response to stress // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19, no. 3. P. 915. DOI: 10.3390/ijms19030915.
12. Popov V.N., Syromyatnikov M.Y., Fernie A.R., Chakraborty S., Gupta K.J., Igamberdiev A.U. The uncoupling of respiration in plant mitochondria: keeping reactive oxygen and nitrogen species under control // *Journal of Experimental Botany*. 2021. Vol. 72, no. 3. P. 793–807. DOI: 10.1093/jxb/eraa510.
13. Yerlikaya B.A., Ates D., Abudureyimu B., Aksoy E. Effect of climate change on abiotic stress response gene networks in *Arabidopsis thaliana* // *Principles and practices of OMICS and genome editing for crop improvement* / eds C.S. Prakash, S. Fiaz, S. Fahad. Cham: Springer, 2022. P. 149–172. DOI: 10.1007/978-3-030-96925-7_6.
14. 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.
15. Alizadeh R., Kumleh H.H., Rezadoost M.H. The simultaneous activity of cytosolic and mitochondrial antioxidant mechanisms in neutralizing the effect of drought stress in soybean // *Plant Physiology Reports*. 2023. Vol. 28, no. 1. P. 78–91. DOI: 10.1007/s40502-022-00704-6.
16. Korotaeva N.E., Shigarova A.M., Katyshev A.I., Fedoseeva I.V., Fedyaeva A.V., Sauchyn D.V., et al. Effect of expression of the *NDB2* heterologous gene of *Arabidopsis thaliana* on growth and respiratory activity of *Nicotiana tabacum* // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2023. Vol. 70. P. 93. DOI: 10.1134/S1021443723600885.
17. Боровский Г.Б., Горбылева Е.Л., Катышев А.И., Коротаева Н.Е., Полякова Е.А., Пятрикас Д.В. [и др.]. Влияние гиперэкспрессии гена альтернативной внешней NADH-дегидрогеназы арабидопсиса на устойчивость трансформированных растений табака к отрицательной температуре // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2023. Т. 13. № 4. С. 516–522. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-516-522. EDN: FNBXUJ.
18. Velikova V., Yordanov I., Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines // *Plant Science*. 2000. Vol. 151, no. 1. P. 59–66. DOI: 10.1016/S0168-9452(99)00197-1.
19. Foyer C.H., Vanacker H., Gomez L.D., Harbinson J. Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2002. Vol. 40, no. 6-8. P. 659–668. DOI: 10.1016/S0981-9428(02)01425-0.
20. Foyer C.H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009. Vol. 11, no. 4. P. 861–905. DOI: 10.1089/ars.2008.2177.
21. Igamberdiev A.U., Bykova N.V. Mitochondria in photosynthetic cells: coordinating redox control and energy balance // *Plant Physiology*. 2023. Vol. 191, no. 4. P. 2104–2119. DOI: 10.1093/plphys/kiac541.
22. Shameer S., Ratcliffe R.G., Sweetlove L.J. Leaf energy balance requires mitochondrial respiration and export of chloroplast NADPH in the light // *Plant Physiology*. 2019. Vol. 180, no. 4. P. 1947–1961. DOI: 10.1104/pp.19.00624.

23. Gandin A., Duffes C., Day D.A., Cousins A.B. The absence of alternative oxidase AOX1a results in altered response of photosynthetic carbon assimilation to increasing CO₂ in *Arabidopsis thaliana* // Plant and Cell Physiology. 2012. Vol. 53, no. 9. P. 1627–1637. DOI: 10.1093/pcp/pcs107.
24. Cheng D., Gao H., Zhang L. Upregulation of mitochondrial alternative oxidase pathway protects photosynthetic apparatus against photodamage under chilling stress in *Rumex K-1* leaves // Photosynthetica. 2020. Vol. 58, no. 5. P. 1116–1121. DOI: 10.32615/ps.2020.060.
25. Cheng D.D., Zhang L.T. Mitochondrial alternative oxidase pathway acts as an electron sink during photosynthetic induction in *Rumex K-1* leaves // Photosynthetica. 2021. Vol. 59, no. 4. P. 615–624. DOI: 10.32615/ps.2021.047.
26. Garmash E.V., Velegzhaninov I.O., Ermolina K.V., Rybak A.V., Malyshev R.V. Altered levels of AOX1a expression result in changes in metabolic pathways in *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation // Plant Science. 2020. Vol. 291. P. 110332. DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.110332.
27. Liu Y.-J., Norberg F.E.B., Szilágyi A., De Paeppe R., Åkerlund H.-E., Rasmusson A.G. The mitochondrial external NADPH dehydrogenase modulates the leaf NADPH/NADP⁺ ratio in transgenic *Nicotiana sylvestris* // Plant & Cell Physiology. 2008. Vol. 49, no. 2. P. 251–263. DOI: 10.1093/pcp/pcn001.
28. Jethva J., Lichtenauer S., Schmidt-Schippers R., Steffen-Heins A., Poschet G., Wirtz M., et al. Mitochondrial alternative NADH dehydrogenases NDA1 and NDA2 promote survival of reoxygenation stress in *Arabidopsis* by safeguarding photosynthesis and limiting ROS generation // New Phytologist. 2023. Vol. 238, no. 1. P. 96–112. DOI: 10.1111/nph.18657.
29. Borovskii G.B., Korotaeva N.E., Katyshev A.I., Fedoseeva I.V., Fedyaeva A.V., Kondakova M.A., et al. The overexpression of the *Arabidopsis NDB2* gene in tobacco plants affects the expression of genes encoding the alternative mitochondrial electron transport pathways and stress proteins // Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology: abstracts of the 6th International scientific conference (Novosibirsk, 14–18 June 2021). Novosibirsk: Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 2021. P. 42. DOI: 10.18699/PlantGen2021-026. EDN: NKNKPO.
30. Elkelish A., Qari S.H., Mazrou Y.S., Abdelaal K.A., Hafez Y.M., Abu-Elsoud A.M., et al. Exogenous ascorbic acid induced chilling tolerance in tomato plants through modulating metabolism, osmolytes, antioxidants, and transcriptional regulation of catalase and heat shock proteins // Plants. 2020. Vol. 9, no. 4. P. 431. DOI: 10.3390/plants9040431.
31. Yurina N.P. Heat shock proteins in plant protection from oxidative stress // Molecular Biology. 2023. Vol. 57. P. 951–964. DOI: 10.1134/S0026893323060201.
32. Kumar R., Khungar L., Shimphui R., Tiwari L.D., Tripathi G., Sarkar N.K., et al. AtHsp101 research sets course of action for the genetic improvement of crops against heat stress // Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 2020. Vol. 29. P. 715–732. DOI: 10.1007/s13562-020-00624-2.
33. Tiwari L.D., Kumar R., Sharma V., Sahu A.K., Sahu B., Naithani S.C., et al. Stress and development phenotyping of Hsp101 and diverse other Hsp mutants of *Arabidopsis thaliana* // Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 2021. Vol. 30. P. 889–905. DOI: 10.1007/s13562-021-00706-9.
34. McLoughlin F., Basha E., Fowler M.E., Kim M., Bordowitz J., Katiyar-Agarwal S., et al. Class I and II small heat shock proteins together with HSP101 protect protein translation factors during heat stress // Plant Physiology. 2016. Vol. 172, no. 2. P. 1221–1236. DOI: 10.1104/pp.16.00536.
35. Kim D.H., Xu Z.-Y., Na Y.J., Yoo Y.-J., Lee J., Sohn E.-J., et al. Small heat shock protein Hsp17.8 functions as an AKR2A cofactor in the targeting of chloroplast outer membrane proteins in *Arabidopsis* // Plant Physiology. 2011. Vol. 157, no. 1. P. 132–146. DOI: 10.1104/pp.111.178681.
36. Leaden L., Busi M.V., Gomez-Casati D.F. The mitochondrial proteins AtHscB and AtIscU1 involved in Fe–S cluster assembly interact with the Hsp70-type chaperon AtHscA2 and modulate its catalytic activity // Mitochondrion. 2014. Vol. 19. P. 375–381. DOI: 10.1016/j.mito.2014.11.002.
37. Myouga F., Motohashi R., Kuromori T., Nagata N., Shinzaki K. An *Arabidopsis* chloroplast-targeted Hsp101 homologue, APG6, has an essential role in chloroplast development as well as heat-stress response // The Plant Journal. 2006. Vol. 48, no. 2. P. 249–260. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2006.02873.x.
38. Oh S.E., Yeung C., Babaie-Rad R., Zhao R. Cosuppression of the chloroplast localized molecular chaperone HSP90.5 impairs plant development and chloroplast biogenesis in *Arabidopsis* // BMC Research Notes. 2014. Vol. 7. P. 643. DOI: 10.1186/1756-0500-7-643.
- ### REFERENCES
1. García-Caparrós P., De Filippis L., Gul A., Hasanuzzaman M., Ozturk M., Altay V., et al. Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review. *The Botanical Review*. 2020;87:421–466. DOI: 10.1007/s12229-020-09231-1.
2. Bartoli C.G., Gómez F., Martínez, D.E., Guamet J.J. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany*. 2004;55(403):1663–1669. DOI: 10.1093/jxb/erh199.
3. Liberatore K.L., Dukowic-Schulze S., Miller M.E., Chen C., Kianian S.F. 2016. The role of mitochondria in plant development and stress tolerance. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;100:238–256. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.033.
4. Sachdev S., Ansari S.A., Ansari M.I., Fujita M., Hasanuzzaman M. Abiotic stress and reactive oxygen species: generation, signaling, and defense mechanisms. *Antioxidants*. 2021;10(2):277. DOI: 10.3390/antiox10020277.
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. Bailey C.D., Carr T.G., Harris S.A., Hughes C.E. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2003;29(3):435–455. DOI: 10.1016/j.ympev.2003.08.021.
7. Saha B., Borovskii G., Panda S.K. Alternative oxidase and plant stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*. 2016;11(12). DOI: 10.1080/15592324.2016.1256530.
8. Garmash E.V. Role of mitochondrial alternative oxidase in the regulation of cellular homeostasis during development of photosynthetic function in greening

leaves. *Plant Biology*. 2021;23(2):221-228. DOI: 10.1111/plb.13217.

9. Elhafez D., Murcha M.W., Clifton R., Soole K.L., Day D.A., Whelan J. Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in Arabidopsis: intraorganelle location and expression. *Plant & Cell Physiology*. 2006;47(1):43-54. DOI: 10.1093/pcp/pci221.

10. Clifton R., Lister R., Parker K.L., Sappl P.G., Elhafez D., Millar A.H., et al. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 2005;58:193-212. DOI: 10.1007/s11103-005-5514-7.

11. Wanniarachchi V.R., Dametto L., Sweetman C., Shavrukov Y., Day D.A., et al. Alternative respiratory pathway component genes (AOX and ND) in rice and barley and their response to stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(3):915. DOI: 10.3390/ijms19030915.

12. Popov V.N., Syromyatnikov M.Y., Fernie A.R., Chakraborty S., Gupta K.J., Igamberdiev A.U. The uncoupling of respiration in plant mitochondria: keeping reactive oxygen and nitrogen species under control. *Journal of Experimental Botany*. 2021;72(3):793-807. DOI: 10.1093/jxb/eraa510.

13. Yerlikaya B.A., Ates D., Abudureyimu B., Aksoy E. Effect of climate change on abiotic stress response gene networks in *Arabidopsis thaliana*. In: Prakash C.S., Fiaz S., Fahad S. (eds). *Principles and practices of OMICS and genome editing for crop improvement*. Cham: Springer; 2022, p. 149-172. DOI: 10.1007/978-3-030-96925-7_6.

14. 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.

15. Alizadeh R., Kumleh H.H., Rezadoost M.H. The simultaneous activity of cytosolic and mitochondrial antioxidant mechanisms in neutralizing the effect of drought stress in soybean. *Plant Physiology Reports*. 2023;28(1):78-91. DOI: 10.1007/s40502-022-00704-6.

16. Korotaeva N.E., Shigarova A.M., Katyshev A.I., Fedoseeva I.V., Fedyaeva A.V., Sauchyn D.V., et al. Effect of expression of the NDB2 heterologous gene of *Arabidopsis thaliana* on growth and respiratory activity of *Nicotiana tabacum*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2023;70:93. DOI: 10.1134/S1021443723600885.

17. Borovskii G.B., Gorbyleva E.L., Katyshev A.I., Korotaeva N.E., Polyakova E.A., Pyatrikas D.V., et al. Effect of the overexpression of external alternative NADH dehydrogenase gene in Arabidopsis on the resistance of transformed tobacco plants to negative temperatures. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):516-522. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-516-522. EDN: FNBXUJ.

18. Velikova V., Yordanov I., Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*. 2000;151(1):59-66. DOI: 10.1016/S0168-9452(99)00197-1.

19. Foyer C.H., Vanacker H., Gomez L.D., Harbinson J. Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2002;40(6-8):659-668. DOI: 10.1016/S0981-9428(02)01425-0.

20. Foyer C.H., Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009;11(4):861-905. DOI: 10.1089/ars.2008.2177.

21. Igamberdiev A.U., Bykova N.V. Mitochondria in photosynthetic cells: coordinating redox control and energy balance. *Plant Physiology*. 2023;191(4):2104-2119. DOI: 10.1093/plphys/kiac541.

22. Shameer S., Ratcliffe, R.G., Sweetlove L.J. Leaf energy balance requires mitochondrial respiration and export of chloroplast NADPH in the light. *Plant Physiology*. 2019;180(4):1947-1961. DOI: 10.1104/pp.19.00624.

23. Gandin A., Duffes C., Day D.A., Cousins A.B. The absence of alternative oxidase AOX1a results in altered response of photosynthetic carbon assimilation to increasing CO₂ in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. 2012;53(9):1627-1637. DOI: 10.1093/pcp/pcs107.

24. Cheng D., Gao H., Zhang L. Upregulation of mitochondrial alternative oxidase pathway protects photosynthetic apparatus against photodamage under chilling stress in *Rumex K-1* leaves. *Photosynthetica*. 2020;58(5):1116-1121. DOI: 10.32615/ps.2020.060.

25. Cheng D.D., Zhang L.T. Mitochondrial alternative oxidase pathway acts as an electron sink during photosynthetic induction in *Rumex K-1* leaves. *Photosynthetica*. 2021;59(4):615-624. DOI: 10.32615/ps.2021.047.

26. Garmash E.V., Velegzhaninov I.O., Ermolina K.V., Rybak A.V., Malyshev R.V. Altered levels of AOX1a expression result in changes in metabolic pathways in *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation. *Plant Science*. 2020;291:110332. DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.110332.

27. Liu Y.-J., Norberg F.E.B., Szilágyi A., De Paepe R., Åkerlund H.-E., Rasmusson A.G. The mitochondrial external NADPH dehydrogenase modulates the leaf NADPH/NADP⁺ ratio in transgenic *Nicotiana sylvestris*. *Plant & Cell Physiology*. 2008;49(2):251-263. DOI: 10.1093/pcp/pcn001.

28. Jethva J., Lichtenauer S., Schmidt-Schippers R., Steffen-Heins A., Poschet G., Wirtz M., et al. Mitochondrial alternative NADH dehydrogenases NDA1 and NDA2 promote survival of reoxygenation stress in Arabidopsis by safeguarding photosynthesis and limiting ROS generation. *New Phytologist*. 2023;238(1):96-112. DOI: 10.1111/nph.18657.

29. Borovskii G.B., Korotaeva N.E., Katyshev A.I., Fedoseeva I.V., Fedyaeva A.V., Kondakova M.A., et al. The overexpression of the Arabidopsis NDB2 gene in tobacco plants affects the expression of genes encoding the alternative mitochondrial electron transport pathways and stress proteins. In: *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology: abstracts of the 6th International scientific conference*. 14–18 June 2021, Novosibirsk. Novosibirsk: Institute of Cytology and Genetics SB RAS; 2021, p. 42. DOI: 10.18699/PlantGen2021-026. EDN: NKNKPO.

30. Elkelish A., Qari S.H., Mazrou Y.S., Abdelaal K.A., Hafez Y.M., Abu-Elsaoud A.M., et al. Exogenous ascorbic acid induced chilling tolerance in tomato plants through modulating metabolism, osmolytes, antioxidants, and transcriptional regulation of catalase and heat shock proteins. *Plants*. 2020;9(4):431. DOI: 10.3390/plants9040431.

31. Yurina N.P. Heat shock proteins in plant protection from oxidative stress. *Molecular Biology*. 2023;57:951-964. DOI: 10.1134/S0026893323060201.

32. Kumar R., Khungar L., Shimphui R., Tiwari L.D., Tripathi G., Sarkar N.K., et al. AtHsp101 research sets course of action for the genetic improvement of crops against heat stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 2020;29:715-732. DOI: 10.1007/s13562-020-00624-2.

33. Tiwari L.D., Kumar R., Sharma V., Sahu A.K., Sahu B., Naithani S.C., et al. Stress and development phenotyping of Hsp101 and diverse other Hsp mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 2021;30:889-905. DOI: 10.1007/s13562-021-00706-9.

34. McLoughlin F., Basha E., Fowler M.E., Kim M., Bordowitz J., Katiyar-Agarwal S., et al. Class I and II small heat shock proteins together with HSP101 protect protein translation factors during heat stress. *Plant Physiology*. 2016;172(2):1221-1236. DOI: 10.1104/pp.16.00536.

35. Kim D.H., Xu Z.-Y., Na Y.J., Yoo Y.-J., Lee J., Sohn E.-J.,

et al. Small heat shock protein Hsp17.8 functions as an AKR2A cofactor in the targeting of chloroplast outer membrane proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2011;157(1):132-146. DOI: 10.1104/pp.111.178681.

36. Leaden L., Busi M.V., Gomez-Casati D.F. The mitochondrial proteins AtHscB and AtIscU1 involved in Fe-S cluster assembly interact with the Hsp70-type chaperon AtHscA2 and modulate its catalytic activity. *Mitochondrion*. 2014;19:375-381. DOI: 10.1016/j.mito.2014.11.002.

37. Myouga F., Motohashi R., Kuromori T., Nagata N., Shinozaki K. An *Arabidopsis* chloroplast-targeted Hsp101 homologue, APG6, has an essential role in chloroplast development as well as heat-stress response. *The Plant Journal*. 2006;48(2):249-60. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2006.02873.x.

38. Oh S.E., Yeung C., Babaei-Rad R., Zhao R. Cosuppression of the chloroplast localized molecular chaperone HSP90.5 impairs plant development and chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *BMC Research Notes*. 2014;7:643. DOI: 10.1186/1756-0500-7-643.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Боровский Геннадий Борисович,

д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе,
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>

Горбылева Елена Леонидовна,

к.б.н., младший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
dzubina@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6858-380X>

Катышев Александр Игоревич,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
byacky78@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7856-0460>

Кортаева Наталья Евгеньевна,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
korotaeva73@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4236-389X>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Gennadii B. Borovskii,

Dr. Sci. (Biology), Professor, Vice-director,
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>

Elena L. Gorbyleva,

Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
dzubina@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6858-380X>

Alexander I. Katyshev,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
byacky78@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7856-0460>

Natalia E. Korotaeva,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
korotaeva73@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4236-389X>

Полякова Елизавета Алексеевна,
аспирант, ведущий инженер,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
polyackova.elizaveta727@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4830-5888>

Пятрикас Дарья Валерьевна,
к.б.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
galdasova@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0009-0001-0444-0447>

Степанов Алексей Владимирович,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
stepanov@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0456-3690>

Федосеева Ирина Владимировна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ fedoseeva.irina2009@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6529-9304>

Шигарова Анастасия Михайловна,
к.б.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
anas_shig@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-8502-4826>

Вклад авторов

Г.Б. Боровский – разработка концепции исследования, обсуждение результатов, написание текста статьи.
Е.Л. Горбылева – проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов.
А.И. Катышев – разработка концепции Исследования, обработка полученных данных, обсуждение результатов, написание текста статьи.
Н.Е. Коротаева – проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи.

Elizaveta A. Polyakova,
Postgraduate Student, Leading Engineer,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
polyackova.elizaveta727@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4830-5888>

Darya V. Pyatrikas,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
galdasova@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0009-0001-0444-0447>

Alexey V. Stepanov,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
stepanov@sifibr.irk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0456-3690>

Irina V. Fedoseeva,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ fedoseeva.irina2009@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6529-9304>

Anastasiya M. Shigarova,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
anas_shig@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-8502-4826>

Contribution of the authors

Gennadii B. Borovskii – research concept development, results discussing, writing the text of manuscript.
Elena L. Gorbyleva – conducting experiments, data processing, results discussing.
Alexander I. Katyshev – research concept development, data processing, results discussing, writing the text of manuscript.
Natalia E. Korotaeva – conducting experiments, data processing, results discussing, visualization, writing the text of manuscript.

Е.А. Полякова – проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи.

Д.В. Пятрикас – проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов.

А.В. Степанов – проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов.

И.В. Федосеева – проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов, написание текста статьи.

А.М. Шигарова – проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов.

Elizaveta A. Polyakova – conducting experiments, data processing, results discussing, visualization, writing the text of manuscript.

Darya V. Pyatrikas – conducting experiments, data processing, results discussing.

Alexey V. Stepanov – conducting experiments, data processing, results discussing.

Irina V. Fedoseeva – conducting experiments, data processing, results discussing, writing the text of manuscript.

Anastasiya M. Shigarova – conducting experiments, data processing, results discussing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 20.10.2024.

Одобрена после рецензирования 10.11.2024.

Принята к публикации 30.11.2024.

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 20.10.2024.

Approved after reviewing 10.11.2024.

Accepted for publication 30.11.2024.

Научная статья
УДК 579.66
EDN: QWSTSZ
DOI: 10.21285/achb.948



Исследование продуктивности и свойств штамма *Weizmannia coagulans*, способного синтезировать L-молочную кислоту

Н.Л. Ертилецкая✉, А.А. Суханова, А.Н. Бояндин,
А.А. Середа, С.Н. Сырцов, Ю.А. Прокопчук

Сибирский государственный университет науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
Красноярск, Российская Федерация

Аннотация. Исследования продуцентов L-молочной кислоты на сегодняшний день представляются весьма актуальными в связи с широкими сферами ее применения. Целью проведенного исследования являлся подбор параметров культивирования термофильного штамма-продуцента L-молочной кислоты *Weizmannia coagulans*, выделенного из молока. В ходе работы выявлено, что продуктивность штамма зависит от температуры культивирования, скорости перемешивания, pH среды, использованного нейтрализующего агента и концентрации глюкозы. По результатам культивирования в колбах и ферментере установлено, что за 56 часов штамм способен продуцировать до 80,4 г/л молочной кислоты при соответствующей средней продуктивности 1,44 г/(л×ч) с конверсией порядка 99%. Самыми оптимальными параметрами для получения наибольших показателей были температура 50 °C, pH среды 6,5, перемешивание 150 об/мин. Показано, что данный штамм не ингибируется высокими концентрациями глюкозы, а, напротив, демонстрирует большую продуктивность при концентрации глюкозы в среде 100–120 г/л. Среди нейтрализующих агентов, используемых для корректировки pH, выбран Са(ОН)₂, который в наименьшей степени влияет на размер клеток продуцента в процессе ферментации и побочные продукты использования которого наименее токсичны. Полученные результаты показывают, что данный штамм требует дальнейших исследований его особенностей метаболизма и генетической модификации для повышения продуктивности, снижения ингибирующего эффекта целевого продукта на метаболизм продуцента и получения повышенных титров молочной кислоты за короткое время ферментации.

Ключевые слова: *Weizmannia coagulans*, молочнокислородное брожение, L-молочная кислота, периодическое культивирование, биотехнологическое получение органических кислот

Финансирование. Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках госзадания на выполнение исследования по теме «Исследование закономерностей химико-биотехнологического синтеза биоразлагаемых полимеров» (проект № FEFE-2024-0027).

Для цитирования: Ертилецкая Н.Л., Суханова А.А., Бояндин А.Н., Середа А.А., Сырцов С.Н., Прокопчук Ю.А. Исследование продуктивности и свойств штамма *Weizmannia coagulans*, способного синтезировать L-молочную кислоту // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 525–536. DOI: 10.21285/achb.948. EDN: QWSTSZ.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Productivity and properties of a *Weizmannia coagulans* strain capable of synthesizing L-lactic acid

Natalya L. Ertiletskaya✉, Anna A. Sukhanova, Anatoly N. Boyandin,
Anna A. Sereda, Sergei N. Syrtsov, Yulia A. Prokopchuk

Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Studies on the producers of L-lactic acid are highly relevant at the moment due to the broad scope of its applications. This study was aimed at selecting culture parameters for a milk-derived thermophilic strain of *Weizmannia*

© Ертилецкая Н.Л., Суханова А.А., Бояндин А.Н., Середа А.А., Сырцов С.Н., Прокопчук Ю.А., 2024

coagulans that is capable of producing L-lactic acid. It was found that the strain productivity depends on the culture temperature, stirring rate, medium pH, used neutralizing agent, and glucose concentration. The culture in flasks and a fermenter revealed that in 56 hours, the strain is capable of producing up to 80.4 g/L of lactic acid at a corresponding average productivity of 1.44 g/(L×h) with a conversion of about 99%. The most optimal parameters to achieve the highest indicators were a temperature of 50 °C, medium pH of 6.5, and a stirring rate of 150 rpm. This strain was shown to be uninhibited by high glucose concentrations; conversely, it exhibited higher productivity at glucose concentrations of 100–120 g/L in the medium. Among the neutralizing agents used for pH adjustment, the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ agent was selected, which has the least effect on the size of producer cells during fermentation and whose by-products are the least toxic. The obtained results indicate that further studies on the metabolic properties and genetic modification of this strain are required in order to increase productivity, reduce the inhibitory effect of the target product on the metabolism of the producer, and obtain elevated lactic acid titers in a short fermentation time.

Keywords: *Weizmannia coagulans*, lactic acid fermentation, L-lactic acid, batch culture, biotechnological production of organic acids

Funding. The Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation supported this study within the state assignment for the implementation of the project “Study of the common principles of chemico-biotechnological synthesis of biodegradable polymers and development of an integrated technology for the production of engineering composite materials with controlled biodegradation for industrial use” (project no. FEFE-2024-0027).

For citation: Ertiletskaya N.L., Sukhanova A.A., Boyandin A.N., Sereda A.A., Syrtsov S.N., Prokopchuk Yu.A. Productivity and properties of a *Weizmannia coagulans* strain capable of synthesizing L-lactic acid. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):525-536. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.948. EDN: QWSTSZ.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время исследования продуцентов молочной кислоты среди отечественных и зарубежных ученых являются весьма актуальными [1–3], что, безусловно, связано с широкими сферами ее применения в пищевой и непищевой промышленности, в том числе в качестве мономера для синтеза биоразлагаемых пластиков [4]. Кроме того, увеличение спроса на такой пластик, как полилактид, повышает и спрос на молочную кислоту заведомо надлежащего качества – главным образом энантиомерно чистую молочную кислоту, содержащую L-изомер [5]. В связи с этим важным направлением работ по синтезу молочной кислоты является выделение новых штаммов и изучение их биологических свойств, селекция существующих активных штаммов-продуцентов и гомоферментативных молочнокислых бактерий, способных синтезировать преимущественно L-молочную кислоту с учетом оптимизации параметров биосинтеза.

Среди продуцентов L-молочной кислоты наиболее часто упоминаются *Lactococcus lactis*, *Lactococcus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* и ряд других истинных молочнокислых бактерий [6–11]. Однако, несмотря на то, что продуктивность данных штаммов может быть достаточно высокой (до 7,5 г/(л×ч)) [6], все они являются мезофилами с верхней границей температурного оптимума не более 42 °C. Между тем сдвиг границы температурного оптимума в сторону более высоких значений практически сводит к нулю риск контаминации сторонней микрофлорой, что является довольно распространенной проблемой в микробиологическом производстве. Использование термофильных продуцентов позволяет совместить процесс молочнокислого брожения с осахариванием целлюлозо-содержащего сырья, которое, как правило, происходит при повышенных температурах [12].

Среди термофильных видов бактерий *Weizmannia coagulans* способен к гомоферментативному синтезу молочной кислоты при относительно высоких значениях продуктивности. Этот вид, ранее известный как *Bacillus coagulans*, недавно был филогенетически реклассифи-

цирован в отдельную монофилетическую группу под названием *Weizmannia* [13]. *W. coagulans* – это грамположительная непатогенная спорообразующая бактерия, продуцирующая молочную кислоту [14]. Известно, что данный вид микроорганизмов относится к микрофлоре молока и молочных продуктов, причем он является одним из тех видов, что остаются даже после пастеризации. Существуют сведения, что данный вид обитает в почве, на поверхности овощей и фруктов (об этом свидетельствует их наличие в микрофлоре консервированных продуктов), в силосных ямах и навозе [15, 16].

В литературных источниках представлены данные об использовании различных штаммов *W. coagulans* для эффективного получения молочной кислоты из различных углеродных субстратов, в том числе из гидролизатов растительных остатков. В частности, в работе Т. Михельсон с соавторами показано, что штамм *W. coagulans* SIM-7 способен расти на средах, содержащих менее сложный источник азота (дрожжевой автолизат) по сравнению с *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20073, и давать высокий титр молочной кислоты [17]. Оптимум роста *W. coagulans* при температурах 45–55 °C практически сводит к нулю риск контаминации культуры и, как показано в некоторых источниках, не требует предварительной стерилизации питательной среды [18, 19]. В литературе неоднократно отмечено значительное преимущество данного штамма, а именно то, что он продуцирует L-молочную кислоту с высокой степенью энантиомерной чистоты (от 97,2 до 99,6%) [19, 20]. Кроме того, С. Чжоу и др. в своей работе показали, что один из штаммов *W. coagulans* (*W. coagulans*) обладает толерантностью к высокой концентрации глюкозы. При периодическом культивировании продуцент полностью израсходовал 240 г/л глюкозы, и выход L-молочной кислоты за 60 ч культивирования при этом составил 210 г/л L-молочной кислоты при продуктивности 3,5 г/(л×ч). В этой же работе одновременное осахаривание крахмала и ферментация при 50 °C без стерилизации среды позволили достичь выхода 202,0 г/л L-молочной кислоты за 48 ч [18]. Этот результат можно считать выдающимся, поскольку до этого времени при таком способе

получения молочной кислоты удавалось получать не более 55,99 г/л молочной кислоты за 49 ч ферментации.

В России исследований о культивировании *W. coagulans* не представлено: в основном описано культивирование таких продуцентов молочной кислоты, как *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracase*, кокковых форм *Lactococcus* и данные перспективного штамма дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* [21]. В работе, описывающей проведенные нами ранее исследования, отмечено, что штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 19-11 и *Lactobacillus acidophilus* 5 Дс продуцируют рацемическую (DL)-молочную кислоту, а штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* продуцирует молочную кислоту с содержанием L-изомера 73% [22]. Таким образом, выделение нового штамма и последующая оптимизация его свойств является перспективным направлением в исследовании продуцентов молочной кислоты и требует его тщательного изучения для пополнения коллекции российских штаммов-продуцентов.

В данной работе исследованы характеристики и продуктивность термофильного штамма-продуцента *W. coagulans*, выделенного из молока, для дальнейшего его применения в высокоэффективном процессе получения молочной кислоты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве субстрата для выделения молочнокислых бактерий использовали молоко пастеризованное 2,5%. На первом этапе выделения в стерильную колбу объемом 250 мл асептически вносили около 100 мл молока и инкубировали в термостате при температуре 45 °С в течение 24 ч. Через 24 ч содержимое колбы использовали для приготовления разведений. Посевы инкубировали при температуре 45 °С в течение 3 суток. По истечении 3 суток чашки с посевами осматривали, выделяли однородные колонии и пересеивали на скошенный агар де Мана – Рогозы – Шарпа (MRS) (Laboratorios CONDA, Испания), затем снова инкубировали при 45 °С в течение 3 суток. Полученные выделенные чистые культуры микроорганизмов использовали для исследований (продукция молочной кислоты, микроскопия и определение видовой принадлежности на масс-спектрометре и 16S-РНК анализом). Выделенную культуру *W. coagulans* в дальнейшем поддерживали на полужидком агаре MRS, который готовили из бульона MRS (НЦП «Биокомпас-С», Россия) с добавлением 0,3% агара.

Видовую принадлежность выделенного продуцента молочной кислоты определяли с помощью анализа 16S-РНК в лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск). Определенный термофильный штамм *W. coagulans* (не запатентован) сохранен в качестве музейной культуры Отдела биоразлагаемых полимерных материалов Сибирского государственного университета науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва. Анализ соотношения изомеров молочной кислоты, продуцируемой выделенным штаммом, определяли по методике, описанной ранее в статье [22].

Исследование влияния состава среды на рост и продуктивность *W. coagulans* проводили в колбах ($n = 3$), содержащих 100 мл одной из питательных сред (бульон MRS, бульон МС1, бульон МС2 и среда с кукурузным экстрактом) в шейкере-инкубаторе ZQTY-70 (Shanghai

Zhichu Instrument Co., Ltd., Китай) при 45, 50 или 55 °С в течение 56 ч при 150 об/мин. После засева и во время культивирования из колб отбирали по 1 мл среды для подсчета клеток, определения глюкозы, молочной кислоты и оптической плотности ранее описанными методами [22]. В качестве нейтрализующего агента использовали CaCO_3 в количестве 10% (10 г). По результатам культивирования определили и сравнили средние значения потребления субстрата и производства молочной кислоты, продуктивность процесса и конверсию. Продуктивность культивирования Y_p за промежуток времени dt считали по следующей формуле:

$$Y_p = \frac{dP}{dt},$$

где dP – прирост в концентрации молочной кислоты, г*л, за временной промежуток dt , ч.

Конверсию субстрата C_s вычисляли по формуле:

$$C_s = \frac{\Delta S}{\Delta P} \times 100\%,$$

где ΔS и ΔP – потребление субстрата и выход молочной кислоты за все время культивирования.

Для культивирования *W. coagulans* были использованы следующие среды:

1. Бульон МС1 (на 1000 мл дистиллированной воды): глюкоза – 50,0–70,0 г, триптон ферментативный – 5,0 г, дрожжевой экстракт – 1,0 г [23].

2. Бульон МС2 (на 1000 мл дистиллированной воды): глюкоза – 100,0 г, дрожжевой экстракт – 2,0 г, аммоний сернокислый – 1,7 г, аммоний фосфорнокислый – 1,0 г [23].

3. Среда с кукурузным экстрактом (на 1000 мл дистиллированной воды): глюкоза – 100,0 г, кукурузный экстракт – 40,0 г, калий фосфорнокислый 2-замещенный 3-водный – 6,25 г.

Исследование влияния температуры на рост и продуктивность *W. coagulans* проводили в колбах ($n = 3$), содержащих 100 мл бульона МС1 в шейкере-инкубаторе при 45, 50 или 55 °С в течение 56 ч при 150 об/мин. После засева и во время культивирования из колб отбирали по 1 мл среды для подсчета клеток, определения глюкозы, молочной кислоты и оптической плотности ранее описанными методами [22]. В качестве нейтрализующего агента использовали CaCO_3 в количестве 10% (10 г). По результатам культивирования определили и сравнили средние значения потребления субстрата и производства молочной кислоты, продуктивность процесса и конверсию.

Исследование влияния скорости перемешивания на рост и продуктивность *W. coagulans* проводили по аналогичной схеме, как и подбор температуры, с сохранением постоянной температуры ферментации на уровне 50 °С в шейкере-инкубаторе при скорости перемешивания 100, 150, 250 или 300 об/мин. Количество параллелей, периодичность отбора проб и определения параметров были такими же, как указано ранее.

Исследования по влиянию исходной концентрации глюкозы на *W. coagulans* проводили по аналогичной предыдущим экспериментам схеме с тем отличием, что во всех экспериментах температура ферментации и скорость перемешивания были постоянными (50 °С и 150 об/мин соответственно), но менялась начальная концентрация глюкозы в среде – 20, 50, 70, 100 и 120 г/л. Количество параллелей, периодичность отбора проб и определения параметров были те же.

Для исследования влияния щелочного агента на *W. coagulans* засев колб со 100 мл среды для культивирования производили аналогично предыдущим экспериментам с добавлением одного из щелочных агентов (10%-й раствор гидроксида натрия, 10%-й раствор гидроксида аммония или порошок гидроксида кальция). Водородный показатель регулировали вручную при каждом отборе проб до значений 6,5–6,7. Культивирование проводили в течение 56 ч при 150 об/мин и температуре 50 °С. При микроскопировании проб делали фотографии для дальнейшего сравнения размера клеток и оценки влияния щелочного агента на морфологию клеток в разные часы культивирования.

Оптимальный pH для культивирования нового штамма подбирали в режиме ферментации в биореакторе (Bioscore, Китай) объемом 5 л (рабочий объем 3 л) с возможностью автоматического поддержания pH. Инокулят готовили внесением рабочей культуры из трех пробирок с полужидкой средой MRS и инкубацией в колбе в шейкере-инкубаторе при 50 °С и 150 об/мин 24 ч. Далее инокулят в объеме 300 мл (10% от рабочего объема) с концентрацией клеток $(3,8-5,4) \times 10^8$ КОЕ/мл асептически вносили в заранее простерилизованный ферментер с соответствующим количеством среды для культивирования (2,7 л). Сразу после внесения отбирали пробы для подсчета клеток и определения концентрации глюкозы и молочной кислоты. Далее отбор проб и определение глюкозы и молочной кислоты производили 3 раза в сутки, подсчет клеток – 1 раз в сутки. Длительность культивирования составила 56 ч. pH поддерживали автоматическим добавлением 15%-го раствора гидроксида кальция на уровне 5,5, 6,0, 6,5 или 7,0. По результатам культивирования ($n = 2$) определили и сравнили средние значения потребления субстрата и производства молочной кислоты, продуктивности процесса и конверсии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам 16S-ПНК анализа доказано, что полученный микроорганизм принадлежит к виду *W. coagulans* и содержит следующую нуклеотидную последовательность:

TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA
AAGCGCGCGCAGGCGGCTTCTTAAGTCTGATGTGAAATCTT
GCGGCTCAACCGCAAGCGGTCATTGGAACTGGGAGGCTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATCCACGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGG
CTCTCTGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGG
GAGCAACAGG.

По результатам хроматографического анализа ментоловых эфиров молочной кислоты, содержащейся в питательной среде после предварительного культивирования данного штамма в 10 мл жидкой среды MRS, установлено, что *W. coagulans* продуцирует преимущественно L-молочную кислоту с энантиомерной чистотой 95,4% (рис. 1).

Влияние состава среды на рост и продуктивность *W. coagulans* исследовано на средах MRS, MC1, MC2 и среде с кукурузным экстрактом. Установлено, что наибольшие значения выхода молочной кислоты при культивировании *W. coagulans* получены на средах MRS и MC1 (рис. 2).

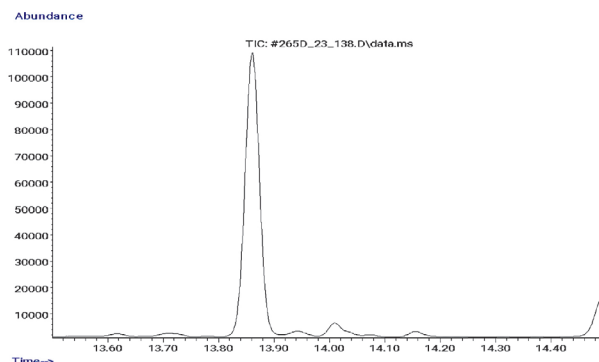


Рис. 1. Результаты хроматографического анализа культуральной жидкости штамма *Weizmannia coagulans* при выращивании на среде MRS (пик на 13,86 мин соответствует деривативу L-молочной кислоты)

Fig. 1. Results of GC-MS analysis of the culture broth of *Weizmannia coagulans* new strain fermented on MRS medium (the peak at 13.86 min corresponds to the L-lactic acid derivative)

Выход молочной кислоты при периодическом культивировании штамма *W. coagulans* на средах MRS и MC1 составил 40 и 69 г/л, соответствующие значения продуктивности составили 0,71 и 1,23 г/(л×ч) (табл. 1).

Таблица 1. Результаты периодического культивирования штамма *Weizmannia coagulans* на различных питательных средах

Table 1. Results of batch fermentation of *Weizmannia coagulans* new strain using various nutrient media

Показатель	Питательная среда			
	MRS	MC1	MC2	КЭ*
Начальная концентрация клеток, КОЕ/мл×10 ⁷	1,07	0,95	1,2	1,01
Выход молочной кислоты, г/л	40,0	69,0	4,2	4,5
Продуктивность, г/(л×ч)	0,71	1,23	0,07	0,08
Потребление глюкозы, г/л	41,1	79,2	45,3	45,5
Конверсия, %	97,3	87,0	9,3	9,9

Примечание. * – среда с кукурузным экстрактом.

Культивирования *W. coagulans* на среде MC2 и среде с кукурузным экстрактом оказались неэффективными из-за крайне низких значений продуктивности при относительно высоком значении потребляемого субстрата. Это можно объяснить тем, что в этих средах отсутствует достаточное количество аминокислот, необходимых для роста и жизнедеятельности бактерий, которые обычно добавляют в виде триптона или пептона. Используемый дрожжевой экстракт в среде MC2 по содержанию белковых форм азота уступает гидролизатам животных тканей. Кроме того, присутствие минеральных источников азота (соли аммония) в среде MC2 дополнительно указывает на то, что именно недостаток аминокислот негативно сказывается на жизнедеятельности бактериальной культуры. Среда MRS и MC1 в большей степени подходят для культивирования данного штамма. Однако, несмотря на несколько сниженное значение конверсии на среде MC1 по сравнению со средой MRS, было принято решение этим пренебречь из-за разности в стоимости

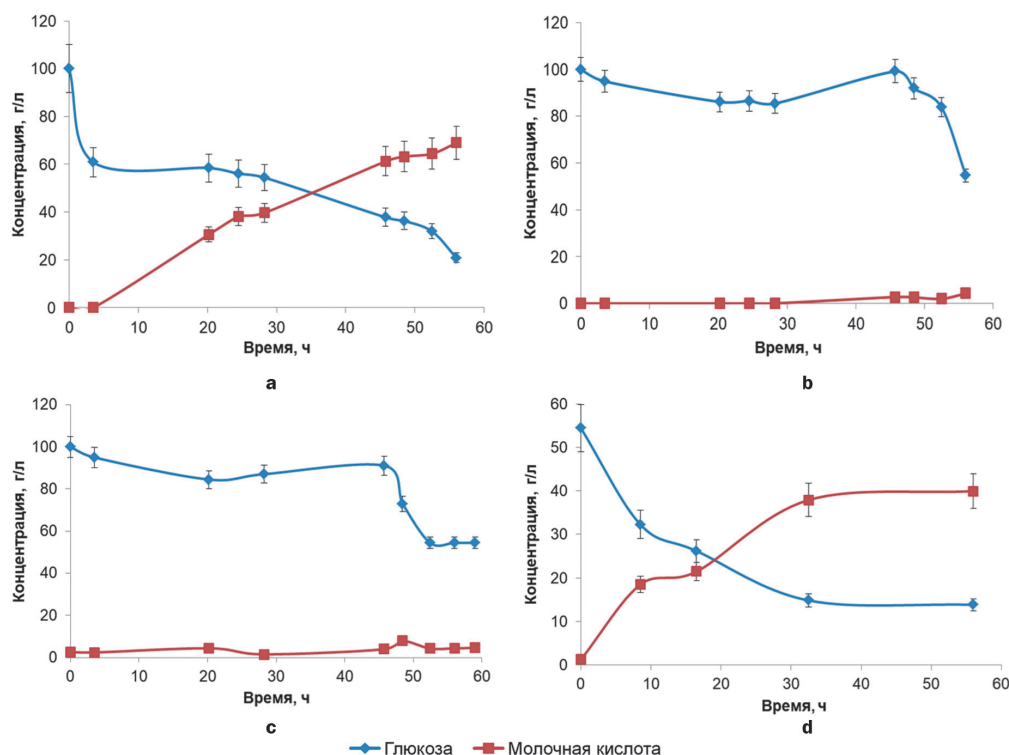


Рис. 2. Результаты периодического культивирования штамма *Weizmannia coagulans* на питательных средах: а – MC1; б – MC2; в – среда с кукурузным экстрактом; д – MRS

Fig. 2. Results of batch fermentation of *Weizmannia coagulans* new strain using various nutrient media: а – MM1; б – MM2; в – corn steep liquor medium; д – MRS medium

данных питательных сред (в среде MRS больше компонентов, за счет чего ее стоимость за килограмм выше), которая нивелирует разницу в конверсии. В последующих исследованиях в качестве среды для культивирования *W. coagulans* использовали среду MC1.

Большинство молочнокислых бактерий относится к мезофилам и растет при умеренных температурах (от 30 до 45 °C). Такой температурный режим, вероятно, связан с условиями естественных сред обитания, главной из которых является желудочно-кишечный тракт человека и других млекопитающих. Как было упомянуто выше, указанный температурный режим требует тщательного соблюдения стерильных условий, что создает дополнительные проблемы при промышленном культивировании молочнокислых бактерий. В таком случае термофильные микроорганизмы более предпочтительны, поскольку температуры их оптимума роста не позволяют развиваться сторонней микрофлоре. Определение оптимума роста продуцента является одной из первостепенных задач на этапе подбора высокоэффективного продуцента молочной кислоты, поскольку именно оптимальная температура считается идеальной средой для клеток и для синтеза ими целевого продукта [24].

При исследовании влияния температуры инкубирования на рост штамма *W. coagulans* было установлено, что из исследованных значений температуры наиболее оптимальной с точки зрения конечного титра молочной кислоты была температура 50 °C (табл. 2). Выход молочной кислоты через 56 ч культивирования составил 80,4 г/л, продуктивность – 1,44 г/(л×ч). В то же время для температурных режимов 45 и 55 °C те

же показатели были на уровне 47,9 и 63,3 г/л и 0,86 и 1,13 г/(л×ч) соответственно. При этом количество потребляемой глюкозы было на уровне 58,8, 81,5 и 65,9 г/л для 45, 50 и 55 °C соответственно. Наибольшая конверсия, соответственно, наблюдалась при культивировании при температуре 50 °C.

Таблица 2. Результаты культивирования штамма *Weizmannia coagulans* при различных температурах

Table 2. Results of *Weizmannia coagulans* new strain fermentation at different temperatures

Показатель	Температура, °C		
	45	50	55
Выход молочной кислоты, г/л	47,89	80,44	63,35
Продуктивность, г/(л×ч)	0,86	1,44	1,13
Потребление глюкозы, г/л	58,84	81,49	65,94
Отношение концентрации клеток на 24-й час к начальной концентрации клеток	151,5	190,8	65,8
Конверсия, %	81,4	98,7	96,2

Помимо прочего стоит отметить, что при температуре 45 и 55 °C продукция молочной кислоты прекратилась уже после 48 ч, в то время как ферментация при 50 °C все еще продолжалась, хотя и продуктивность между 48 и 56 ч снизилась и была на уровне 0,13 г/(л×ч). Что касается изменения концентрации клеток, то численность клеток в ходе культивирования при 50 °C возросла более чем в 190 раз, при 45 °C – в 151 раз, при 55 °C – в 66 раз.

В лабораторной микробиологической практике оптимальная температура роста продуцента, как правило, значительно ближе к максимальной, чем к минимальной. При этой температуре полностью меняется реакция роста на изменение температуры, а фактическая скорость роста представляет собой компромисс между активирующим и тормозящим действием температуры. Таким образом, клетки, выращенные при оптимальной температуре, уже частично ингибируются температурой. Изменение температуры роста в сторону повышения, как правило, значительно снижает рост клеток, так как происходит инактивация большей части ферментов бактериальной клетки. Кроме того, в случае спорообразующих бактерий, к которым относится *W. coagulans*, повышенные температуры могут индуцировать спорообразование. Понижение температуры влияет главным образом на состояние клеточной мембраны, снижая ее текучесть, что отражается в нарушении транспорта веществ между клеткой и окружающей средой [24] и закономерном снижении продуктивности, как было показано в проведенном нами исследовании при 45 °C.

В работах других авторов, посвященных исследованию *W. coagulans* (*B. coagulans*), указаны температурные оптимумы 50–52 °C [25–27], различия в выходе молочной кислоты при которых, как правило, незначительны. Однако показано, что при более высоких температурах (57 °C) наблюдается значительное снижение продуктивности [23].

Перемешивание среды является одним из важных факторов ферментации, обеспечивающим максимальную продуктивность процесса. Перемешивание в условиях инкубаторов осуществляется посредством создающего центробежную силу вращения платформы и может влиять на массоперенос и в некоторой степени на аэрацию процесса.

По результатам подбора скорости перемешивания культуры штамма *W. coagulans* было установлено, что самым оптимальным является перемешивание при 150 об/мин, при котором выход молочной кислоты за 56 ч составил 80,4 г/л (табл. 3). При перемешивании со скоростью 100, 250 и 300 об/мин выходы молочной кислоты снизились и составили 55,8, 47,1 и 40,6 г/л соответственно. Продуктивность, соответственно, так же была различной – 1,0, 1,44, 0,84 и 0,59 г/(л×ч) по возрастанию скорости перемешивания.

Таблица 3. Результаты культивирования штамма *Weizmannia coagulans* при различных скоростях перемешивания

Table 3. Results of *Weizmannia coagulans* new strain fermentation at different stirring rates

Показатель	Перемешивание, об/мин			
	100	150	250	300
Выход молочной кислоты, г/л	55,77	80,44	47,13	40,65
Продуктивность, г/(л×ч)	1,00	1,44	0,84	0,59
Потребление глюкозы, г/л	56,12	81,49	63,68	66,60
Отношение концентрации клеток на 24-й час к начальной концентрации клеток	36,0	190,8	95,2	137,1
Конверсия, %	99,4	98,7	74,0	50,0

Изменение концентрации клеток через 24 ч значительно различалось для разных скоростей перемешивания. При скорости перемешивания 100 об/мин концентрация клеток через 24 ч увеличилась в 36 раз, тогда как этот же показатель увеличился в 95, 137 и более чем 190 раз при скоростях перемешивания 250, 300 и 150 об/мин соответственно. Наибольшая конверсия субстрата на уровне 98–99% наблюдалась при скоростях перемешивания 100 и 150 об/мин при том, что при увеличении оборотов она снижалась до 50%.

Полученные результаты показывают, что скорость перемешивания 150 об/мин является наиболее оптимальной для данного штамма, что отразилось в показателях продуктивности и изменении численности клеток.

Продукция молочной кислоты гомоферментативными молочнокислыми бактериями происходит по пути Эмбдена – Майергофа – Парнаса, в котором исходным субстратом является глюкоза. Глюкоза может попадать в бактериальную клетку напрямую из среды посредством диффузии через клеточную мембрану либо опосредованно в результате превращений других сахаров (лактоза, мальтоза, целлобиоза и др.) [28]. Однако, несмотря на возможность использования самых разных субстратов, в числе которых растительные отходы сельского хозяйства, в условиях промышленного производства глюкоза все еще остается самым часто используемым.

Разные виды продуцентов молочной кислоты обладают различной толерантностью к концентрациям глюкозы в среде. Во время культивирования продуцентов молочной кислоты осмотическое давление, вызванное глюкозой, повышается из-за избыточных источников углерода, что приводит к задержке роста клеток и низкой эффективности производства [23, 29].

По результатам культивирования нового штамма *W. coagulans* при различных начальных концентрациях глюкозы установлено, что при начальных концентрациях глюкозы 20, 50, 70, 100 и 120 г/л за 56 ч культивирования средние значения выхода молочной кислоты находились в диапазоне от 54,1 до 67,1 г/л (табл. 4).

Таблица 4. Результаты культивирования штамма *Weizmannia coagulans* при различных начальных концентрациях глюкозы

Table 4. Results of *Weizmannia coagulans* new strain fermentation at different initial glucose concentrations

Показатель	Начальная концентрация глюкозы, г/л				
	20	50	70	100	120
Выход молочной кислоты, г/л	54,07	57,43	52,12	67,10	62,21
Продуктивность, г/(л×ч)	0,97	1,03	0,93	1,20	1,11
Потребление глюкозы, г/л	55,60	72,02	53,02	71,72	70,08
Отношение концентрации клеток на 24-й час к начальной концентрации клеток	96,8	58,0	7,7	5,8	7,7
Конверсия, %	97,2	79,7	96,4	93,6	88,8

Суммарное потребление глюкозы за все время культивирования отличалось и составило 55,6, 72,0, 53,0, 71,7 и 70,1 г/л глюкозы с конверсией 97,2, 79,7, 94,4, 93,6, и 88,8% соответственно. Концентрация клеток в среде

через 24 ч от начала культивирования значительно повысилась (в 60–100 раз) при более низких концентрациях глюкозы (20 и 50 г/л), в то время как при концентрациях 70, 100 и 120 г/л этот показатель вырос всего в 6–8 раз.

Стоит отметить, что при культивировании с начальными концентрациями 20 и 50 г/л по мере истощения субстрата вносили подпитку (раствор глюкозы 700 г/л): в случае начальной концентрации 20 г/л – по 4 мл раствора через 12 и 30 ч от начала культивирования, в случае 50 г/л – 3 мл раствора через 33 ч от начала культивирования. По окончании культивирования остаточное содержание субстрата в соответствующих колбах составляло менее 10 г/л.

Полученные результаты показывают, что данный штамм *W. coagulans* не ингибируется высокими концентрациями глюкозы, а, напротив, демонстрирует большую продуктивность при концентрации глюкозы в среде 100–120 г/л. Более того, ферментация в таких условиях позволяет обойтись без дополнительных подпиток субстратом, что снижает трудозатратность процесса.

Характерной чертой молочнокислого брожения является значительное падение водородного показателя вследствие накопления молочной кислоты, которое отражается на жизнедеятельности продуцента. В частности, низкие значения pH среды приводят к снижению внутриклеточного pH и потере активности клеточных ферментов за счет их высокого протонирования и изменения заряда, что отражается в значительном снижении продуктивности продуцента и ингибировании его роста [30].

Выбор подходящего щелочного агента для поддержания pH процесса зависит от разных факторов, в частности от культуры-продуцента, состава среды, предполагаемого способа дальнейшей очистки и др.

В данной работе подбор оптимального щелочного агента проводили путем ферментации на колбах при периодическом добавлении щелочного агента через определенные промежутки времени при падении pH ниже 5,5

По результатам эксперимента было установлено, что среди исследованных щелочных агентов наиболее оптимальным в плане выхода молочной кислоты и влияния на морфологию клеток *W. coagulans* является гидроксид кальция (табл. 5). Выход молочной кислоты при использовании этого щелочного агента был в 2 раза выше по сравнению с культивированиями при использовании гидроксидов натрия и аммония.

Таблица 5. Результаты культивирования штамма *Weizmannia coagulans* с использованием различных щелочных агентов (нерегулярное поддержание pH)

Table 5. Results of *Weizmannia coagulans* new strain fermentation using different neutralizing agents (irregular pH maintenance)

Показатель	Щелочной агент		
	NaOH	NH ₄ OH	Ca(OH) ₂
Выход молочной кислоты, г/л	5,03	5,84	10,17
Продуктивность, г/(л×ч)	0,09	0,10	0,18
Потребление глюкозы, г/л	29,68	29,98	26,76
Отношение концентрации клеток на 24-й час к начальной концентрации клеток	99,1	82,6	47,6
Конверсия, %	16,9	19,5	38,0

Установлено, что при культивировании с добавлением различных щелочных агентов средний размер клеток через 24 и 48 ч культивирования различался. В частности, при культивировании с добавлением гидроксидов натрия и аммония средний размер клеток через 24 ч составлял 29,6±21,3 и 41,5±15,3 мкм, через 48 ч – 38,5±14 и 43,0±16,9 мкм соответственно (рис. 3). При добавлении гидроксида кальция соответствующее значение через 24 и 48 ч составило 80,6±28,7 и 73,3±4,8 мкм. Средний размер клеток *W. coagulans* в начале культивирования составил 130,7±95,0 мкм.

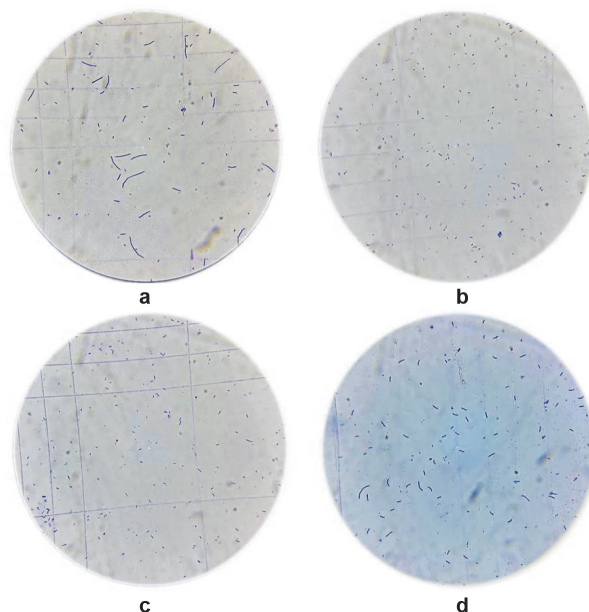


Рис. 3. Клетки *Weizmannia coagulans* при культивировании с использованием различных щелочных агентов: а – до добавления щелочных агентов (0 часов); б – подщелачивание гидроксидом натрия (24-й час); в – подщелачивание гидроксидом аммония (24-й час); д – подщелачивание гидроксидом кальция (24-й час) (увеличение 400х, окрашивание генцианвиолетом)

Fig. 3. *Weizmannia coagulans* cells fermented using different neutralizing agents: а – before neutralization (0 h); б – neutralization with sodium hydroxide (24th h); в – neutralization with ammonium hydroxide (24th h); д – neutralization with calcium hydroxide (24th h) (400x magnification, stained with gentian violet)

Эти результаты показывают, что при использовании гидроксида кальция в качестве щелочного агента размер клеток больше, чем при использовании гидроксида натрия и гидроксида аммония. Вероятно, это связано с тем, что по сравнению с гидроксидами аммония и натрия, которые при взаимодействии с молочной кислотой образуют лактаты аммония и натрия соответственно, при большом накоплении в среде вызывающие у продуцента осмотический стресс, Ca(OH)₂ осаждает молочную кислоту в виде лактата кальция, тем самым снижая ее токсичное влияние на рост и морфологию бактериальной клетки [31].

Культивирование продуцента при оптимальном значении pH позволяет поддерживать жизнедеятель-

ность продуцента на должном уровне и обеспечивает стабильное протекание его метаболических процессов, что положительно сказывается на его продуктивности. Культивирование при значениях pH ниже оптимальных обычно приводит к сокращению или полному прекращению продукции молочной кислоты, поскольку в этом случае изменяется структура клеточной мембраны и, как следствие, нарушается работа перистальтических систем клетки, которые обеспечивают выход продуцируемых веществ во внешнюю среду [32]. Кроме того, при низких значениях pH молекулы синтезируемой молочной кислоты оказываются в среде в протонированной (незаряженной) форме, что позволяет им беспрепятственно возвращаться обратно в бактериальную клетку путем диффузии [31]. Внутренние ресурсы клетки при этом перенаправляются на выравнивание кислотно-щелочного баланса посредством синтеза соединений сторонних метаболических путей. На настоящий момент механизмы, обеспечивающие регулирование внутриклеточного pH *W. coagulans*, полностью не исследованы, однако есть сведения, что в этом участвует белок MFS путем транспортировки H⁺ с внутриклеточной стороны на внеклеточную сторону при транспортировке его субстрата [33].

По результатам серии культивирований установлено, что оптимальный диапазон культивирования нового штамма *W. coagulans* составляет 6,0–7,0, причем, если сравнивать крайние значения этого диапазона и среднее значение (pH 6,5), отличия в выходе молочной кислоты незначительны (табл. 6). В частности, выход молочной кислоты при культивировании при значениях pH данного диапазона был на уровне 51,4–52,6 г/л за 56 ч. При этом при культивировании при pH 5,5 выход снизился до 34,0 г/л.

Точно так же продуктивность была практически одинаковой для значений pH 6,0, 6,5 и 7,0, тогда как при pH 5,5 она была ниже на 0,2–0,3 г/л. Интересно, что численность клеток при этом значительно не отличалась. Это может указывать на то, что в случае пониженного pH внутренние ресурсы клеток задействованы в адаптации к пониженному pH в ущерб продукции молочной кислоты. Ю. Чэнь с соавторами при помощи геномного модели-

Таблица 6. Результаты культивирования штамма *Weizmannia coagulans* при различных значениях pH

Table 6. Results of *Weizmannia coagulans* new strain fermentation at different pH

Показатель	pH			
	5,5	6,0	6,5	7,0
Выход молочной кислоты, г/л	33,88	51,44	52,26	47,40
Продуктивность, г/(л×ч)	0,60	0,92	0,93	0,85
Потребление глюкозы, г/л	56,16	60,99	57,04	48,89
Отношение концентрации клеток на 24-й час к начальной концентрации клеток	17,2	12,4	26,7	14,0
Конверсия, %	60,3	84,3	91,6	97,0

рования одного из штаммов *W. coagulans* установили, что гликолитические потоки, представленные реакцией образования фруктозо-6-фосфата, уменьшались при pH 5,5, что отразилось в снижении потребления глюкозы. При этом потоки фосфокетолазного и ацетаткиназного путей, наоборот, стимулировались, что означает, что потоки углерода были перенаправлены в сторону пути фосфокетолазы. Между тем цепь переноса электронов показала повышенные потоки при pH 5,5 [34]. Эти данные означают, что *W. coagulans* может использовать несколько механизмов адаптации к пониженному pH.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам проведенных экспериментов, наибольший достигнутый выход молочной кислоты в ходе культивирования нового штамма *W. coagulans* при оптимальных параметрах (50 °C, 150 об/мин, pH 6,5, начальная концентрация глюкозы 100–120 г/л) за 56 ч составил 80,4 г/л при соответствующей средней продуктивности 1,43 г/(л×ч). Полученные результаты показывают, что данный штамм требует дальнейших исследований его особенностей метаболизма и генетической модификации для повышения продуктивности, снижения ингибирующего эффекта целевого продукта на метаболизм продуцента и получения повышенных титров молочной кислоты за короткое время ферментации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Abedi E., Hashemi S.M.B. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art // *Heliyon*. 2020. Vol. 6, no. 10. P. e04974. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04974.
2. Ojo A.O., de Smidt O. Lactic acid: a comprehensive review of production to purification // *Processes*. 2023. Vol. 11, no. 3. P. 688. DOI: 10.3390/pr11030688.
3. Kim J., Kim Y.-M., Lebaka V.R., Wee Y.-J. Lactic acid for green chemical industry: recent advances in and future prospects for production technology, recovery, and applications // *Fermentation*. 2022. Vol. 8, no. 11. P. 609. DOI: 10.3390/fermentation8110609.
4. Komesu A., Oliveira J.A.R.d., Martins L.H.d.S., Wolf Maciel M.R., Maciel Filho R. Lactic acid production to purification: a review // *BioResources*. 2017. Vol. 12, no. 2. P. 4364–4383. DOI: 10.15376/biores.12.2.Komesu.
5. Auras R., Harte B., Selke S. An overview of polylactides as packaging materials // *Macromolecular Bioscience*. 2004. Vol. 4, no. 9. P. 835–864. DOI: 10.1002/mabi.200400043.
6. Tian X., Liu X., Zhang Y., Chen Y., Hang H., Chu J., et al. Metabolic engineering coupled with adaptive evolution strategies for the efficient production of high-quality L-lactic acid by *Lactobacillus paracasei* // *Bioresource Technology*. 2021. Vol. 323. P. 124549. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124549.
7. Kuo Y.-C., Yuan S.-F., Wang C.-A., Huang Y.-J., Guo G.-L., Hwang W.-S. Production of optically pure L-lactic acid from lignocellulosic hydrolysate by using a newly isolated and D-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus paracasei* strain // *Bioresource Technology*. 2015. Vol. 198. P. 651–657. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.09.071.
8. Romanova M.V., Dolbunova A.N., Epishkina Y.M., Evdokimova S.A., Kozlovskiy M.R., Kuznetsov A.Y., et al. A thermophilic L-lactic acid producer of high optical purity: isolation and identification // *Foods and Raw Materials*. 2024. Vol. 12, no. 1. P. 101–109. DOI: 10.21603/2308-4057-2024-1-591.
9. Okano K., Uematsu G., Hama S., Tanaka T., Noda H., Kondo A., et al. Metabolic engineering of *Lactobacillus*

- plantarum* for direct L-lactic Acid production from raw corn starch // *Biotechnology Journal*. 2018. Vol. 13, no. 5. P. 1700517. DOI: 10.1002/biot.201700517.
10. Liu T., Xu X., Liu Y., Li J., Du G., Lv X., et al. Engineered microbial cell factories for sustainable production of L-lactic acid: a critical review // *Fermentation*. 2022. Vol. 8, no. 6. P. 279. DOI: 10.3390/fermentation8060279.
11. Kwan T.H., Vlysidis A., Wu Z., Hu Y., Koutinas A., Lin C.S.K. Lactic acid fermentation modelling of *Streptococcus thermophilus* YI-B1 and *Lactobacillus casei* Shirota using food waste derived media // *Biochemical Engineering Journal*. 2017. Vol. 127. P. 97–109. DOI: 10.1016/j.bej.2017.08.012.
12. Park I., Kim I., Kang K., Sohn H., Rhee I., Jin I., et al. Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 // *Process Biochemistry*. 2010. Vol. 45, no. 4. P. 487–492. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.11.006.
13. Gupta R.S., Patel S., Saini N., Chen S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020. Vol. 70, no. 11. P. 5753–5798. DOI: 10.1099/ijsem.0.004475.
14. Konuray G., Erginkaya Z. Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry // *Foods*. 2018. Vol. 7, no. 6. P. 92. DOI: 10.3390/foods7060092.
15. De Clerck E., Rodriguez-Diaz M., Forsyth G., Lebbe L., Logan N.A., De Vos P. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species // *Systematic and Applied Microbiology*. 2004. Vol. 27, no. 1. P. 50–60. DOI: 10.1078/0723-2020-00250.
16. Bischoff K.M., Liu S., Hughes S.R., Rich J.O. Fermentation of corn fiber hydrolysate to lactic acid by the moderate thermophile *Bacillus coagulans* // *Biotechnology Letters*. 2010. Vol. 32. P. 823–828. DOI: 10.1007/s10529-010-0222-z.
17. Michelson T., Kask K., Jõgi E., Talpsep E., Suitso I., Nurk A. L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073 // *Enzyme and Microbial Technology*. 2006. Vol. 39, no. 4. P. 861–867. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.01.015.
18. Zhou X., Ye L., Wu J.C. Efficient production of L-lactic acid by newly isolated thermophilic *Bacillus coagulans* WCP10-4 with high glucose tolerance // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013. Vol. 97. P. 4309–4314. DOI: 10.1007/s00253-013-4710-7.
19. Ye L., Zhou X., Hudari M.S.B., Li Z., Wu J.C. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106 // *Bioresource Technology*. 2013. Vol. 132. P. 38–44. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.011.
20. Maas R.H.W., Bakker R.R., Jansen M.L.A., Visser D., de Jong E., Eggink G., et al. Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008. Vol. 78. P. 751–758. DOI: 10.1007/s00253-008-1361-1.
21. Пат. № 2650669, Российская Федерация, C12N 1/19, C12P 7/56, C12R 1/85. Штамм *Schizosaccharomyces pombe* – продуцент молочной кислоты / Л.Н. Борщевская, Т.А. Гордеева, М.М. Вустин, М.А. Великая, А.Н. Калинина, С.П. Синеокий. Заявл. 21.12.2016; опубл. 16.04.2018. Бюл. № 11.
22. Суханова А.А., Ертилецкая Н.Л., Бояндин А.Н., Сырцов С.Н., Середа А.А., Прокопчук Ю.А. [и др.]. Исследование характеристик роста штаммов-продуцентов молочной кислоты с использованием глюкозного сиропа в качестве источника углерода // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2023. Т. 13. N 2. С. 245–254. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-2-245-254. EDN: HUUHAE.
23. Zhang F., Liu J., Han X., Gao C., Ma C., Tao F., et al. Kinetic characteristics of long-term repeated fed-batch (LtRFb) L-lactic acid fermentation by a *Bacillus coagulans* strain // *Engineering in Life Sciences*. 2020. Vol. 20, no. 12. P. 562–570. DOI: 10.1002/elsc.202000043.
24. Aragno M. Responses of microorganisms to temperature // *Physiological plant ecology I: responses to the physical environment* / eds O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler. Berlin – Heidelberg: Springer, 1981. P. 339–369. DOI: 10.1007/978-3-642-68090-8_12.
25. Chen Y., Sun Y., Liu Z., Dong F., Li Y., Wang Y. Genome-scale modeling for *Bacillus coagulans* to understand the metabolic characteristics // *Biotechnology and Bioengineering*. 2020. Vol. 117, no. 11. P. 3545–3558. DOI: 10.1002/bit.27488.
26. Chen Y., Dong F., Wang Y. Systematic development and optimization of chemically defined medium supporting high cell density growth of *Bacillus coagulans* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. Vol. 100. P. 8121–8134. DOI: 10.1007/s00253-016-7644-z.
27. De Oliveira R.A., Schneider R., Rossell C.E.V., Filho R.M., Venus J. Polymer grade L-lactic acid production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Bacillus coagulans* // *Bioresource Technology Reports*. 2019. Vol. 6. P. 26–31. DOI: 10.1016/j.biteb.2019.02.003.
28. Abdel-Rahman M.A., Tashiro Y., Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes // *Biotechnology Advances*. 2013. Vol. 31, no. 6. P. 877–902. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.04.002.
29. Åkerberg C., Hofvendahl K., Zacchi G., Hahn-Hägerdal B. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998. Vol. 49. P. 682–690. DOI: 10.1007/s002530051232.
30. Lund P.A., De Biase D., Liran O., Scheler O., Mira N.P., Cetecioglu Z., et al. Understanding how microorganisms respond to acid pH is central to their control and successful exploitation // *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. P. 556140. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556140.
31. Juturu V., Wu J.C. Microbial production of lactic acid: the latest development // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016. Vol. 36, no. 6. P. 967–977. DOI: 10.3109/07388551.2015.1066305.
32. Guan N., Liu L. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020. Vol. 104. P. 51–65. DOI: 10.1007/s00253-019-10226-1.

33. Tian W., Qin J., Lian C., Yao Q., Wang X. Identification of a major facilitator superfamily protein that is beneficial to L-lactic acid production by *Bacillus coagulans* at low pH // BMC Microbiology. 2022. Vol. 22. P. 310. DOI: 10.1186/s12866-022-02736-2.

34. Chen Y., Sun Y., Liu Z., Dong F., Li Y., Wang Y. Genome-scale modeling for *Bacillus coagulans* to understand the metabolic characteristics // Biotechnology and Bioengineering. 2020. Vol. 117, no. 11. P. 3545–3558. DOI: 10.1002/bit.27488.

REFERENCES

1. Abedi E., Hashemi S.M.B. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*. 2020;6(10):e04974. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04974.

2. Ojo A.O., de Smidt O. Lactic acid: a comprehensive review of production to purification. *Processes*. 2023;11(3):688. DOI: 10.3390/pr11030688.

3. Kim J., Kim Y.-M., Lebaka V.R., Wee Y.-J. Lactic acid for green chemical industry: recent advances in and future prospects for production technology, recovery, and applications. *Fermentation*. 2022;8(11):609. DOI: 10.3390/fermentation8110609.

4. Komesu A., Oliveira J.A.R.d., Martins L.H.d.S., Wolf Maciel M.R., Maciel Filho R. Lactic acid production to purification: a review/ *BioResources*. 2017;12(2):4364-4383. DOI: 10.15376/biores.12.2.Komesu.

5. Auras R., Harte B., Selke S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience*. 2004;4(9):835-864. DOI: 10.1002/mabi.200400043.

6. Tian X., Liu X., Zhang Y., Chen Y., Hang H., Chu J., et al. Metabolic engineering coupled with adaptive evolution strategies for the efficient production of high-quality L-lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. *Bioresource Technology*. 2021;323:124549. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124549.

7. Kuo Y.-C., Yuan S.-F., Wang C.-A., Huang Y.-J., Guo G.-L., Hwang W.-S. Production of optically pure L-lactic acid from lignocellulosic hydrolysate by using a newly isolated and D-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus paracasei* strain. *Bioresource Technology*. 2015;198:651-657. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.09.071.

8. Romanova M.V., Dolbunova A.N., Epishkina Y.M., Evdokimova S.A., Kozlovskiy M.R., Kuznetsov A.Y., et al. A thermophilic L-lactic acid producer of high optical purity: isolation and identification. *Foods and Raw Materials*. 2024;12(1):101-109. DOI: 10.21603/2308-4057-2024-1-591.

9. Okano K., Uematsu G., Hama S., Tanaka T., Noda H., Kondo A., et al. Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for direct L-lactic Acid production from raw corn starch. *Biotechnology Journal*. 2018;13(5):1700517. DOI: 10.1002/biot.201700517.

10. Liu T., Xu X., Liu Y., Li J., Du G., Lv X., et al. Engineered microbial cell factories for sustainable production of L-lactic acid: a critical review. *Fermentation*. 2022;8(6):279. DOI: 10.3390/fermentation8060279.

11. Kwan T.H., Vlysidis A., Wu Z., Hu Y., Koutinas A., Lin C.S.K. Lactic acid fermentation modelling of *Streptococcus thermophilus* YI-B1 and *Lactobacillus casei* Shirota using food waste derived media. *Biochemical Engineering Journal*. 2017;127:97-109. DOI: 10.1016/j.bej.2017.08.012.

12. Park I., Kim I., Kang K., Sohn H., Rhee I., Jin I., et al. Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *Process Biochemistry*. 2010;45(4):487-492. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.11.006.

13. Gupta R.S., Patel S., Saini N., Chen S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed

as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020;70(11):5753-5798. DOI: 10.1099/ijsem.0.004475.

14. Konuray G., Erginkaya Z. Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry. *Foods*. 2018;7(6):92. DOI: 10.3390/foods7060092.

15. De Clerck E., Rodriguez-Diaz M., Forsyth G., Lebbe L., Logan N.A., De Vos P. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. *Systematic and Applied Microbiology*. 2004;27(1):50-60. DOI: 10.1078/0723-2020-00250.

16. Bischoff K.M., Liu S., Hughes S.R., Rich J.O. Fermentation of corn fiber hydrolysate to lactic acid by the moderate thermophile *Bacillus coagulans*. *Biotechnology Letters*. 2010;32:823-828. DOI: 10.1007/s10529-010-0222-z.

17. Michelson T., Kask K., Jögi E., Talpsep E., Suitso I., Nurk A. L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;39(4):861-867. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.01.015.

18. Zhou X., Ye L., Wu J.C. Efficient production of L-lactic acid by newly isolated thermophilic *Bacillus coagulans* WCP10-4 with high glucose tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97:4309-4314. DOI: 10.1007/s00253-013-4710-7.

19. Ye L., Zhou X., Hudari M.S.B., Li Z., Wu J.C. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. *Bioresource Technology*. 2013;132:38-44. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.011.

20. Maas R.H.W., Bakker R.R., Jansen M.L.A., Visser D., de Jong E., Eggink G., et al. Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;78:751-758. DOI: 10.1007/s00253-008-1361-1.

21. Borshchevskaya L.N., Gordeeva T.L., Vustin M.M., Velikaya M.A., Kalinina A.N., Sineokij S.P. *Schizosaccharomyces pombe* strain – lactic acid producer. Patent RF, no. 2650669; 2018. (In Russian).

22. Sukhanova A.A., Ertiletskaya N.L., Boyandin A.N., Syrtsov S.N., Sereda A.A., Prokopchuk Yu.A., et al. Growth characteristics of lactic acid-producing strains using glucose syrup as a carbon source. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(2):245-254. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-2-245-254. EDN: HIUHAE.

23. Zhang F., Liu J., Han X., Gao C., Ma C., Tao F., et al. Kinetic characteristics of long-term repeated fed-batch (LTrFb) L-lactic acid fermentation by a *Bacillus coagulans* strain. *Engineering in Life Sciences*. 2020;20(12):562-570. DOI: 10.1002/elsc.202000043.

24. Aragno M. Responses of microorganisms to temperature. In: Lange O.L., Nobel P.S., Osmond C.B., Ziegler H. (eds). *Physiological plant ecology I: responses to the physical environment*. Berlin – Heidelberg: Springer; 1981, p. 339-369. DOI: 10.1007/978-3-642-68090-8_12.

25. Chen Y., Sun Y., Liu Z., Dong F., Li Y., Wang Y. Genome-scale modeling for *Bacillus coagulans* to understand the metabolic characteristics. *Biotechnology and Bioengineering*. 2020;117(11):3545-3558. DOI: 10.1002/bit.27488.

26. Chen Y., Dong F., Wang Y. Systematic development and optimization of chemically defined medium supporting high cell density growth of *Bacillus coagulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100:8121-8134. DOI: 10.1007/s00253-016-7644-z.

27. De Oliveira R.A., Schneider R., Rossell C.E.V., Filho R.M., Venus J. Polymer grade L-lactic acid production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Bacillus coagulans*. *Bioresource Technology Reports*. 2019;6:26-31. DOI: 10.1016/j.biteb.2019.02.003.

28. Abdel-Rahman M.A., Tashiro Y., Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 2013;31(6):877-902. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.04.002.

29. Åkerberg C., Hofvendahl K., Zacchi G., Hahn-Hägerdal B. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic

acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998. Vol. 49. P. 682–690. DOI: 10.1007/s002530051232.

30. Lund P.A., De Biase D., Liran O., Scheler O., Mira N.P., Cetecioglu Z., et al. Understanding how microorganisms respond to acid pH is central to their control and successful exploitation. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:556140. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556140.

31. Juturu V., Wu J.C. Microbial production of lactic acid: the latest development. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016;36(6):967-977. DOI: 10.3109/07388551.2015.1066305.

32. Guan N., Liu L. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020;104:51-65. DOI: 10.1007/s00253-019-10226-1.

33. Tian W., Qin J., Lian C., Yao Q., Wang X. Identification of a major facilitator superfamily protein that is beneficial to L-lactic acid production by *Bacillus coagulans* at low pH. *BMC Microbiology*. 2022;22:310. DOI: 10.1186/s12866-022-02736-2.

34. Chen Y., Sun Y., Liu Z., Dong F., Li Y., Wang Y. Genome-scale modeling for *Bacillus coagulans* to understand the metabolic characteristics. *Biotechnology and Bioengineering*. 2020;117(11):3545-3558. DOI: 10.1002/bit.27488.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Ертилецкая Наталья Леонидовна,

младший научный сотрудник,
Сибирский государственный университет
науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
660037, г. Красноярск, Проспект имени газеты
«Красноярский рабочий», 31,
Российская Федерация,
✉ natalya.ertiletskaya@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2626-893X>

Суханова Анна Алексеевна,

к.б.н., старший научный сотрудник,
начальник отдела биоразлагаемых
полимерных материалов,
Сибирский государственный университет
науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
660037, г. Красноярск, Проспект имени газеты
«Красноярский рабочий», 31,
Российская Федерация,
shumilova.ann@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5830-1450>

Бояндин Анатолий Николаевич,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский государственный университет
науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
660037, г. Красноярск, Проспект имени газеты
«Красноярский рабочий», 31,
Российская Федерация,
boyandin@biopolymer.pro
<https://orcid.org/0000-0002-9190-2792>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalya L. Ertiletskaya,

Junior Researcher,
Reshetnev Siberian State University
of Science and Technology,
31, Gazeta Krasnoyarskii Rabochii Ave.,
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,
✉ natalya.ertiletskaya@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2626-893X>

Anna A. Sukhanova,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Head of the Department of Biodegradable
Polymer Materials,
Reshetnev Siberian State University
of Science and Technology,
31, Gazeta Krasnoyarskii Rabochii Ave.,
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,
shumilova.ann@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5830-1450>

Anatoly N. Boyandin,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Reshetnev Siberian State University
of Science and Technology,
31, Gazeta Krasnoyarskii Rabochii Ave.,
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,
boyandin@biopolymer.pro
<https://orcid.org/0000-0002-9190-2792>

Серёда Анна Алексеевна,
младший научный сотрудник,
Сибирский государственный университет
науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
660037, г. Красноярск, Проспект имени газеты
«Красноярский рабочий», 31,
Российская Федерация,
nensi.sereda@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0007-1891-4846>

Сырцов Сергей Николаевич,
научный сотрудник,
Сибирский государственный университет
науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
660037, г. Красноярск, Проспект имени газеты
«Красноярский рабочий», 31,
Российская Федерация,
kaideil@list.ru
<https://orcid.org/0009-0001-6308-0031>

Прокопчук Юлия Александровна,
лаборант-исследователь,
Сибирский государственный университет
науки и технологий им. М.Ф. Решетнёва,
660037, г. Красноярск, Проспект имени газеты
«Красноярский рабочий», 31,
Российская Федерация,
batori_bloody@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0005-4653-0319>

Anna A. Sereda,
Junior Researcher,
Reshetnev Siberian State University
of Science and Technology,
31, Gazeta Krasnoyarskii Rabochii Ave.,
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,
nensi.sereda@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0007-1891-4846>

Sergei N. Syrtsov,
Researcher,
Reshetnev Siberian State University
of Science and Technology,
31, Gazeta Krasnoyarskii Rabochii Ave.,
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,
kaideil@list.ru
<https://orcid.org/0009-0001-6308-0031>

Yulia A. Prokopchuk,
Laboratory Assistant,
Reshetnev Siberian State University
of Science and Technology,
31, Gazeta Krasnoyarskii Rabochii Ave.,
Krasnoyarsk, 660037, Russian Federation,
batori_bloody@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0005-4653-0319>

Вклад авторов

Н.Л. Ертилецкая – выполнение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов, написание текста статьи.
А.А. Суханова – запрашивание финансирования, обсуждение результатов, написание текста статьи.
А.Н. Бояндин – развитие методологии, обсуждение результатов.
А.А. Серёда – проведение экспериментов, обсуждение результатов.
С.Н. Сырцов – обсуждение результатов, подготовка текста статьи.
Ю.А. Прокопчук – проведение экспериментов, обработка полученных данных.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 24.05.2024.
Одобрена после рецензирования 26.06.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

Contribution of the authors

Natalya L. Ertiletskaya – conducting experiments, data processing, results discussion, writing the text of manuscript.
Anna A. Sukhanova – funding acquisition, results discussion, writing the text of manuscript.
Anatoly N. Boyandin – methodology development, results discussion.
Anna A. Sereda – conducting experiments, results discussion.
Sergei N. Syrtsov – results discussion, preparing the text of manuscript.
Yulia A. Prokopchuk – conducting experiments, data processing.

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 24.05.2024.
Approved after reviewing 26.06.2024.
Accepted for publication 30.11.2024.

Научная статья
УДК 579.222
EDN: EFTDQV
DOI: 10.21285/achb.940



Использование водной фазы процесса гидротермального охижения как субстрата для культивирования микроводорослей

С.В. Клементьев*, Е.А. Буденкова**, Ю.В. Куликова**, А.С. Сироткин*

*Казанский национальный исследовательский технологический университет,
Казань, Российская Федерация

**Балтийский Федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Российская Федерация

Аннотация. Цель проведенного исследования заключалась в изучении способности 9 штаммов микроводорослей из коллекции IPPAS Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН использовать в качестве субстрата компоненты водной фазы процесса гидротермального охижения избыточного активного ила. Для отбора наиболее перспективных культур были проанализированы их ростовые характеристики, а также эффективность удаления ионов NH_4^+ , PO_4^{3-} и органических соединений. Отмечено, что все изучаемые культуры способны использовать компоненты водной фазы в качестве питательного субстрата. Наибольшая удельная скорость роста $0,92 \text{ сут.}^{-1}$ наблюдалась у штамма *Chlorella* sp. IPPAS C-1210. При этом было показано, что по эффективности изъятия поллютантов из среды перспективными оказались штаммы *Parachlorella kessleri* IPPAS C-9 и *Chlorella minutissima* IPPAS C-123: эффективность ассимиляции NH_4^+ составила 78 и 81%, а PO_4^{3-} – 89 и 91% соответственно. Исследован состав биомассы культур C-9 и C-123, большую часть которой составляют полисахариды – 41 и 44%, а также белки – 31 и 25% от общей массы соответственно. Кроме того, в результате последовательной двухэтапной очистки водной фазы с использованием микроорганизмов-деструкторов (*Paenarthrobacter nicotinovorans* и *Comamonas testosteroni*) и культур микроводорослей была достигнута высокая степень обезвреживания среды. В течение 17 суток процесса очистки концентрация ионов аммония снизилась с $289,8 \pm 14,9$ до $51,1 \pm 2,2 \text{ мг/дм}^3$, фосфатов – с $116,3 \pm 8,1$ до $11,3 \text{ мг/дм}^3$, общая эффективность процесса удаления поллютантов из водной фазы составляла до 90%.

Ключевые слова: микроводоросли, гидротермальное охижение, водная фаза, ростовые характеристики

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант Российского научного фонда 23-24-00064 «Разработка технологии гидротермального охижения избыточных илов и осадков первичных отстойников с утилизацией образующихся сточных вод»).

Для цитирования: Клементьев С.В., Буденкова Е.А., Куликова Ю.В., Сироткин А.С. Использование водной фазы процесса гидротермального охижения как субстрата для культивирования микроводорослей // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 537–547. DOI: 10.21285/achb.940. EDN: EFTDQV.

Utilization of the aqueous phase of the hydrothermal liquefaction process as a substrate for microalgae cultivation

Svyatoslav V. Klementev*✉, Ekaterina A. Budenkova**,
Yulia V. Kulikova**, Alexander S. Sirotkin*

*Kazan National Research Technological University, Kazan, Russian Federation

**Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. The article presents the culturing of nine microalgae strains from the IPPAS collection of IFR RAS using components of the aqueous phase of the excessive activated sludge hydrothermal revitalization process as a substrate. In order to select the most promising cultures, their growth characteristics and efficient removal of NH_4^+ ions, PO_4^{3-} and organic compounds were studied. All the studied cultures are shown to be able to utilize components of the aqueous phase as a nutrient substrate. The highest specific growth rate of 0.92 day^{-1} was observed in the strain *Chlorella* sp. IPPAS C-1210. However, the *Parachlorella kessleri* IPPAS C-9 and *Chlorella minutissima* IPPAS C-123 strains were also promising in terms of their efficiency of pollutant removal from the medium: efficiency of ammonium nitrogen assimilation was 78 and 81%, while phosphate ion assimilation was 89 and 91%, respectively. The biomass composition of C-9 and C-123 cultures was investigated, mainly consisting of polysaccharides – at 41 and 44% – and proteins – at 31 and 25% of the total mass, respectively. A high degree of neutralization of the medium was additionally achieved as a result of consecutive two-stage purification of the aqueous phase of the process of hydrothermal revitalization of excessive activated sludge with the use of microorganisms-destroyers (*Paenarthrobacter nicotinovorans* and *Comamonas testosteroni*) and the studied microalgae cultures. During 17 days of the purification process, the concentration of ammonium ions decreased from 289.8 ± 14.9 to $51.1 \pm 2.2 \text{ mg/dm}^3$, phosphates from 116.3 ± 8.1 to 11.3 mg/dm^3 ; the overall efficiency of the process of pollutants removal from the aqueous phase was up to 90%.

Keywords: microalgae, hydrothermal liquefaction, water phase, growth characteristics

Funding. Russian Science Foundation (project no. 23-24-00064) supported this work.

For citation: Klementev S.V., Budenkova E.A., Kulikova Yu.V., Sirotkin A.S. Utilization of the aqueous phase of the hydrothermal liquefaction process as a substrate for microalgae cultivation. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):537-547. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.940. EDN: EFTDQV.

ВВЕДЕНИЕ

Избыточный активный ил – побочный продукт процесса биологической очистки сточных вод. Его особенностью является высокая влажность (95–99%) и содержание большого количества токсичных органических соединений и патогенных микроорганизмов [1]. Если осадки сточных вод не утилизировать, то со временем органический углерод под действием мезофильных бактерий преобразуется до парниковых газов (CO_2 , CH_4), которые выбрасываются в атмосферу [2, 3]. Наиболее распространенными методами обработки и обезвреживания муниципального осадка являются анаэробное сбраживание, компостирование и захоронение. Компостирование и захоронение отходов приводят к дополнительному отчуждению территорий и выбросу парниковых газов в атмосферу, в то время как сбраживание позволяет восстановить до 50–60% углерода в виде биогаза. Тем не менее недавнее исследование показало, что даже на очистных сооружениях с метантенками значительное количество метана выбрасывается в атмосферу [4]. Таким образом, необходимо изменить подход к утилизации осадков сточных вод, опираясь на современные требования.

Гидротермальное оживление является многообещающей технологией для утилизации влажных органических отходов. В ходе проведения данного процесса биомасса избыточного ила находится в субкритических условиях ($T = 250\text{--}450 \text{ }^\circ\text{C}$, $P = 4\text{--}25 \text{ МПа}$) [5]. Во время гидротермального оживления происходят реакции, включающие разложение и реполимеризацию органических макромолекул, в результате которых образуется био-нефть, твердая фаза (биоуголь), газовая фаза и водная фаза (растворенные в воде химические вещества). К основным преимуществам гидротермального оживления можно отнести то, что в ходе этого процесса не требуется предварительная сушка сырья и установка, использующаяся при данной технологии, занимает меньшую площадь по сравнению с другими, ко всему прочему, таким образом можно получить продукты с добавленной стоимостью [6]. Главным недостатком такой технологии является образование большого количества водной фазы (до 90% от массы сырья), которую нельзя напрямую сбросить в природные водоемы из-за высокой концентрации токсичных соединений [6, 7].

Водная фаза содержит в своем составе высокую концентрацию биогенных элементов (азота, фосфора) и микроэлементов, тем самым ее можно использовать в качестве основы для питательной среды для культивирования микроводорослей [7]. В ряде работ было показано, что использование питательных веществ, содержащихся в водной фазе, приводит к повышению энергоэффективности и экономической целесообразности процесса гидротермального оживления [8–11]. Оценка жизненного цикла показала, что за счет использования водной фазы гидротермального оживления окупаемость инвестиций в энергию была увеличена на 10–20% с точки зрения добычи нефти на единицу энергии, полученной в результате повторного роста микроводорослей с использованием водной фазы [12]. Однако в водной фазе помимо биогенных элементов содержатся и токсичные соединения (амиды, ароматические соединения), которые ингибируют рост микроводорослей, вследствие чего необходимо большое ее разведение либо предварительная обработка с использованием альтернативных методов биологической конверсии [7]. К перспективным способам обезвреживания водной фазы можно отнести аэробную конверсию с применением микроорганизмов-деструкторов, которые способны использовать в качестве единственного источника углерода компоненты водной фазы [13–15]. В предыдущих исследованиях было показано, что микроорганизмы-деструкторы способны обезвреживать в основном только органические соединения, а эффективность изъятия биогенных элементов варьирует в интервале от 10 до 30% [16]. Последовательная очистка сначала микроорганизмами, а после микроводорослями позволит повысить эффективность обезвреживания водной фазы [8].

Цель представленного исследования заключалась в проведении оценки эффективности биообезвреживания водной фазы после гидротермального оживления биомассы избыточного активного ила с использованием микроводорослей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В ходе работы исследовали водную фазу гидротермального оживления избыточного активного ила коммунально-бытовых сточных вод г. Калининграда. Физико-химические показатели были следующими: химическое потребление кислорода (ХПК) – 17737 ± 886 мгО/дм³; NH_4^+ – 948 ± 47 дм³; PO_4^{3-} – 472 ± 24 дм³; рН = $7,1 \pm 0,19$.

Анализировали 9 культур микроводорослей, взятых из коллекции IPPAS¹ Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва) (табл. 1).

Таблица 1. Культуры исследованных микроводорослей

Table 1. Cultures of microalgae discussed in the article

Шифр штамма IPPAS	Вид
C-1	<i>Chlorella sorokiniana</i>
C-2	<i>Chlorella vulgaris</i>
C-8	<i>Chlorella ellipsoidea</i>
C-9	<i>Parachlorella kessleri</i>
C-26	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>
C-108	<i>Chlorella zofingiensis</i>
C-123	<i>Chlorella minutissima</i>
C-1210	<i>Chlorella</i> sp.
C-1509	<i>Nannochloris</i> sp.

Также изучали бактериальные культуры-деструкторы компонентов водной фазы *Paenarthrobacter nicotinovorans* и *Comamonas testosteroni*, полученные из активного ила ПАО «Нижекамскнефтехим» (г. Нижнекамск) и идентифицированные с помощью секвенирования гена 16S рРНК.

Рост культуры оценивали по измерению оптической плотности OP_{750} и приросту биомассы [17]. Отобранные для измерения сухой массы пробы осаждали центрифугированием в фосфатном буфере, полученный осадок высушивали в предварительно взвешенных емкостях в сушильном шкафу 24 ч при 105°C [17]. Удельную скорость роста m вычисляли по изменению концентрации биомассы по формуле

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N_2}{N_1}\right)}{t_2 - t_1},$$

где N_1 и N_2 – биомасса культуры, измеренная во время t_1 и t_2 соответственно.

Время удвоения биомассы $T_{\text{удв.}}$ рассчитывали по удельной скорости роста по формуле

$$T_{\text{удв.}} = \frac{\ln(2)}{\mu}.$$

Конечный прирост Π_k определяли по разности концентраций биомассы в начале и в конце культивирования [17].

Эффективность обезвреживания компонентов водной фазы оценивали по изменению показателей ХПК, NH_4^+ и PO_4^{3-} . Физико-химические характеристики по окончании культивирования определяли по стандартным методикам. Концентрацию ХПК определяли титрованием с помощью соли Мора арбитражным методом². Содержание в водной фазе ионов аммония и фосфат-ионов измеряли на спектрофотометре согласно федеративным природоохранным нормативным документам^{3,4}.

¹ International Physical Protection Advisory Service (IPPAS) // International Atomic Energy Agency (IAEA). Режим доступа: <https://www.iaea.org/services/review-missions/international-physical-protection-advisory-service-ippas> (дата обращения: 12.03.2024).

² ПНД Ф 14.1:2.100-97. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений химического потребления кислорода в пробах природных и очищенных сточных вод титриметрическим методом. М., 2016. 16 с.

³ ПНД Ф 14.1:2.3.1-95. Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовой концентрации ионов аммония в природных и сточных водах фотометрическим методом с реактивом Несслера. М., 2017. 22 с.

⁴ ПНД Ф 14.1:2.112-97. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации фосфат-ионов в пробах природных и очищенных сточных вод фотометрическим методом восстановлением аскорбиновой кислоты. М., 2011. 15 с.

Состав биомассы водорослей определяли по содержанию белка, углеводов, липидов и золы.

В стационарной фазе роста культуры отделяли от водной фазы, промывали деионизированной водой. Сухую биомассу получали путем высушивания полученного осадка в предварительно взвешенных емкостях в сушильном шкафу в течение 24 ч при 105 °C [17]. В сухой биомассе определяли количественный состав.

Клеточные белки экстрагировали солиubilизацией осадка в изоэлектрофокусирующем буфере (7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 2% масс/об. 3-[3-холомидопропилдиметиламмоний]-1-пропансульфоната гидрат и 40 мМ дитиотреитол). Клеточный лизат дважды обрабатывали на ультразвуковой установке в течение 1 мин при частоте 30 кГц. Осадок центрифугировали в течение 1 мин при 10000 об/мин, супернатант отмывали ацетоном в соотношении супернатанта и ацетона 1:4 и инкубировали при 4 °C в течение 20 мин, после повторно центрифугировали. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда в 96-луночных микропланшетах [18].

Полисахариды в биомассе водорослей определяли с помощью антронового реактива. Предварительно клетки водорослей нагревали до 95 °C в течение 10 мин. После озвучивали клетки (условия см. выше), суспензию остужали и добавляли антроновый реактив в соотношении 1:3, выдерживали в течение 20 мин и определяли концентрацию. Количество полисахаридов определяли в 96-луночных планшетах при длине волны 620 нм [19].

Для определения содержания липидов в колбу, содержащую сухую биомассу водорослей, добавляли смесь растворителя (гексана и хлороформа в соотношении 1:1 по объему) в количестве 100 мл на 1 грамм абсолютно сухой биомассы. Экстракцию парами растворителя осуществляли кипячением с обратным холодильником в течение 2 ч. По прошествии времени избыток растворителя удаляли на ротаторном испарителе при температуре 40 °C и давлении 0,786 атм. [9].

Зольность определяли путем сжигания сухой биомассы водорослей в муфельной печи при 550 °C в течение 2 ч [9].

Бактериальные культуры культивировали на водной фазе гидротермального охижения избыточного активного ила в конических колбах в течение 48 ч при $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и перемешивании 120 об/мин. Количество вносимого инокулята составляло, КОЕ/мл: *P. nicotinovorans* – $3,8 \times 10^8$; *C. testosteroni* – $5,7 \times 10^9$. По истечении времени культивирования бактериальные клетки удаляли центрифугированием при 10000 об/мин, полученную водную фазу подкисляли до pH = 7,0 и вносили в нее предварительно адаптированный инокулят микроводорослей.

Обработка результатов экспериментов проводилась с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2019 и Origin 2019 Pro с оценкой достоверности по критерию Стьюдента – Фишера. Использовали параметрический t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Периодическое культивирование микроводорослей на водной фазе. Водную фазу предварительно разбавляли в 50 раз дистиллированной водой до концентрации растворенных веществ, мг/дм³:

ХПК – $354,7 \pm 12,3$; NH_4^+ – $18,9 \pm 1,1$; PO_4^{3-} – $9,4 \pm 0,7$. Такая концентрация водной фазы, согласно литературным данным, не ингибирует рост хлореллы в процессе периодического культивирования [7]. Результаты культивирования 9 штаммов микроводорослей на водной фазе показаны на рис. 1.

В ходе периодического культивирования было показано, что изучаемые штаммы, за исключением *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509, способны использовать компоненты водной фазы в качестве субстрата.

Рост культур на водной фазе можно описать классической сигмоидальной кривой роста. Можно отметить, что на начальном этапе культивирования некоторые микроводоросли адаптировались к компонентам водной фазы и наблюдалась продолжительная лаг-фаза, которая длилась до 3 суток (культуры *C. sorokiniana* IPPAS C-1, *C. pyrenoidosa* IPPAS C-26). У штаммов *C. vulgaris* IPPAS C-2, *C. ellipsoidea* IPPAS C-8, *P. kessleri* IPPAS C-9, *C. zofingiensis* IPPAS C-108 экспоненциальная фаза роста началась со 2-х суток – вероятно, это связано с тем, что водная фаза для них менее токсична и их ферментативная система быстро адаптировалась под условия среды. Интересная ситуация наблюдалась у культуры *C. minutissima* IPPAS C-123: по результатам культивирования у нее отсутствовала лаг-фаза. С 1-х суток отмечался стремительный рост, на 2-е сутки культура вышла на стационарную фазу и деление клеток резко снизилось. Тем не менее в период с 3-х по 5-е сутки снова был зарегистрирован экспоненциальный рост: можно сказать, что в ходе описания кривой роста штамма *C. minutissima* IPPAS C-123 на водной фазе наблюдалась диауксия роста.

Экспоненциальная фаза большинства микроводорослей начиналась на 2–3 сутки и продолжалась в течение 24–48 ч. На 5-е сутки культивирования практически все культуры вышли на стационарную фазу роста и потребление субстрата стало постепенно снижаться.

Таким образом, в ходе периодического культивирования в течение 7 суток все изучаемые культуры вышли на стационарную фазу роста, за исключением штамма *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509, у которого наблюдался небольшой рост на начальном этапе.

В табл. 2 отражены основные показатели культивирования микроводорослей на водной фазе.

Таблица 2. Ростовые характеристики изучаемых культур микроводорослей в процессе периодического культивирования

Table 2. Growth characteristics of the studied microalgae cultures in the process of periodic cultivation

Номер штамма IPPAS	Удельная скорость роста, сут. ⁻¹	Время удвоения биомассы, ч	Конечный прирост, г/л
C-1	0,30	55,34	0,19
C-2	0,49	33,71	0,41
C-8	0,51	32,83	0,49
C-9	0,62	26,57	0,69
C-26	0,48	34,19	0,48
C-108	0,79	20,80	0,44
C-123	0,92	17,91	0,77
C-1210	0,94	17,67	0,32
C-1509	0,27	61,40	0,04

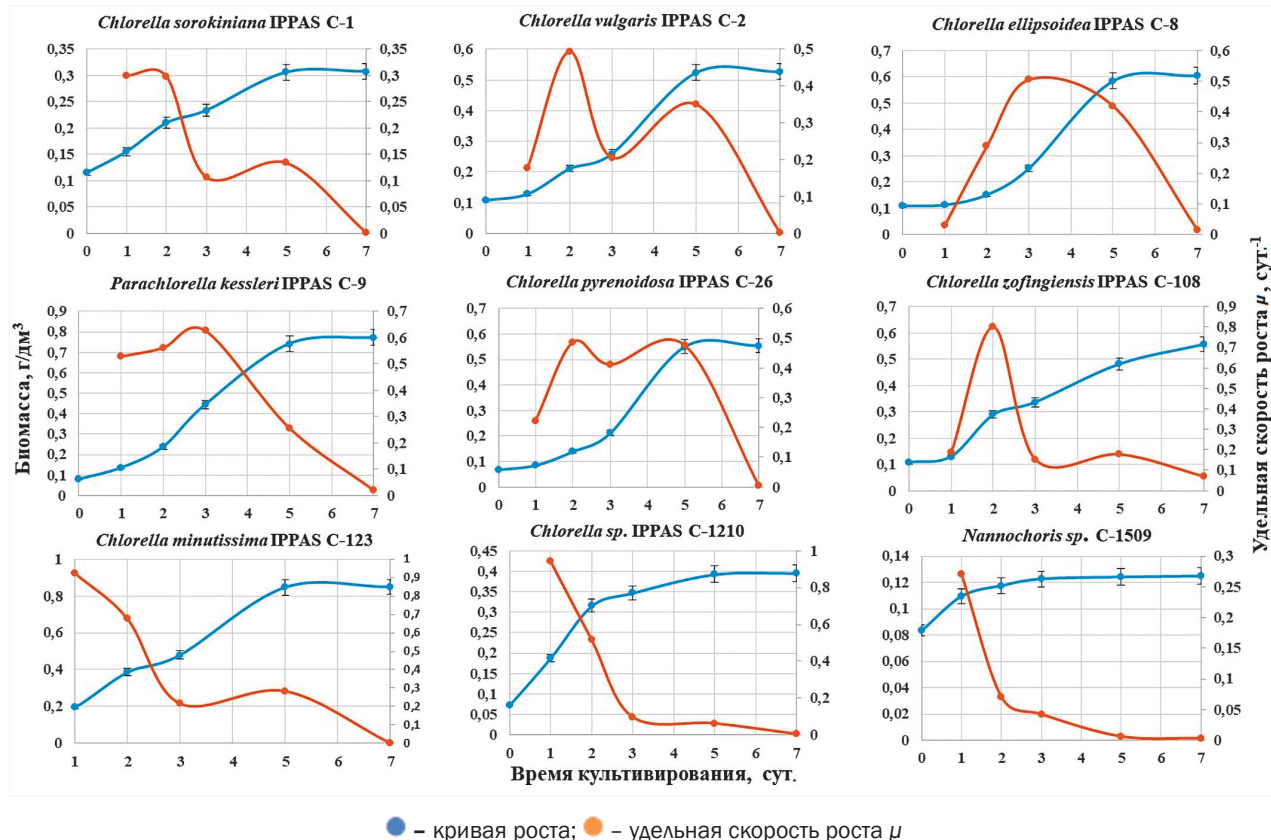


Рис. 1. Кривые роста и удельные скорости роста исследованных штаммов

Fig. 1. Growth curves and specific growth rates of the strains studied

Штамм *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 имел один из самых высоких показателей удельной скорости роста, а время удвоения биомассы в экспоненциальной фазе составило 17,67 ч. Однако экспоненциальная фаза у этого штамма длилась 2 суток и уже в начале стационарной фазы время удвоения увеличилось до 84,3 ч. Конечный прирост штамма был ниже средних значений среди исследуемых штаммов и составил 0,32 г/л.

У штаммов *C. sorokiniana* IPPAS C-1, *C. vulgaris* IPPAS C-2, *C. ellipsoidea* IPPAS C-8, *C. pyrenoidosa* IPPAS C-26, *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 значение удельной скорости роста находилось в диапазоне 0,27–0,49 сут.⁻¹, что соответствует времени удвоения биомассы 61,40–33,71 ч. Урожайность этих культур составила 0,04–0,48 г/л. Можно отметить, что культура *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 имела самый низкий прирост и меньшую удельную скорость роста по сравнению с изучаемыми штаммами.

Штаммы *P. kessleri* IPPAS C-9, *C. zofingiensis* IPPAS C-108, *C. minutissima* IPPAS C-123 имели самые высокие показатели удельной скорости роста (после культуры *Chlorella* sp. IPPAS C-1210) 0,62–0,92 сут.⁻¹ и, соответственно, быструю скорость удвоения биомассы 26,57–17,91 ч. Культура *C. zofingiensis* IPPAS C-108 из-за короткой экспоненциальной фазы роста имела средний прирост биомассы, который составил 0,44 г/л. Можно отметить, что по сравнению с изучаемыми штаммами культуры *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123 отличались высокой продуктивностью 0,69 и 0,77 г/л соответственно.

Удаление загрязняющих веществ водной фазы. По истечении 7 суток культивирования оценивали потребление микроводорослями загрязняющих веществ (NH_4^+ , PO_4^{3-} , ХПК). Эффективность удаления показана на рис. 2.

Все изучаемые культуры в той или иной степени потребляли ионы аммония и фосфаты из водной фазы. Эффективность изъятия NH_4^+ варьировала от 30 до 82%. Штаммы *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123 показали лучший результат по удалению аммония из водной фазы. Концентрация снижалась с 18,9 до 4,1 и 3,8 мг/дм³ для *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123 соответственно, эффективность составляла 78 и 81%. Можно отметить культуры *C. vulgaris* IPPAS C-2, *C. pyrenoidosa* IPPAS C-26, *C. zofingiensis* IPPAS C-108, которые менее активно использовали аммонийный азот – степень изъятия составила 71, 72 и 60% соответственно. Низкое потребление аммонийного азота было отмечено у *C. sorokiniana* IPPAS C-1, *C. ellipsoidea* IPPAS C-8, *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 – вероятнее, для роста и развития этих культур более необходим азот в нитратной форме, нежели в аммонийной. В то же время авторами было сказано, что некоторые виды хлореллы предпочитают азот в аммоний форме, так как его легче трансформировать в аминный для дальнейшего синтеза собственных белков [20].

Часть азота в водной фазе присутствует в органической растворимой форме – по-видимому, он легко ассимилируется культурами *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123, что свидетельствует о снижении ХПК на 41 и 48% соответственно. Штамм

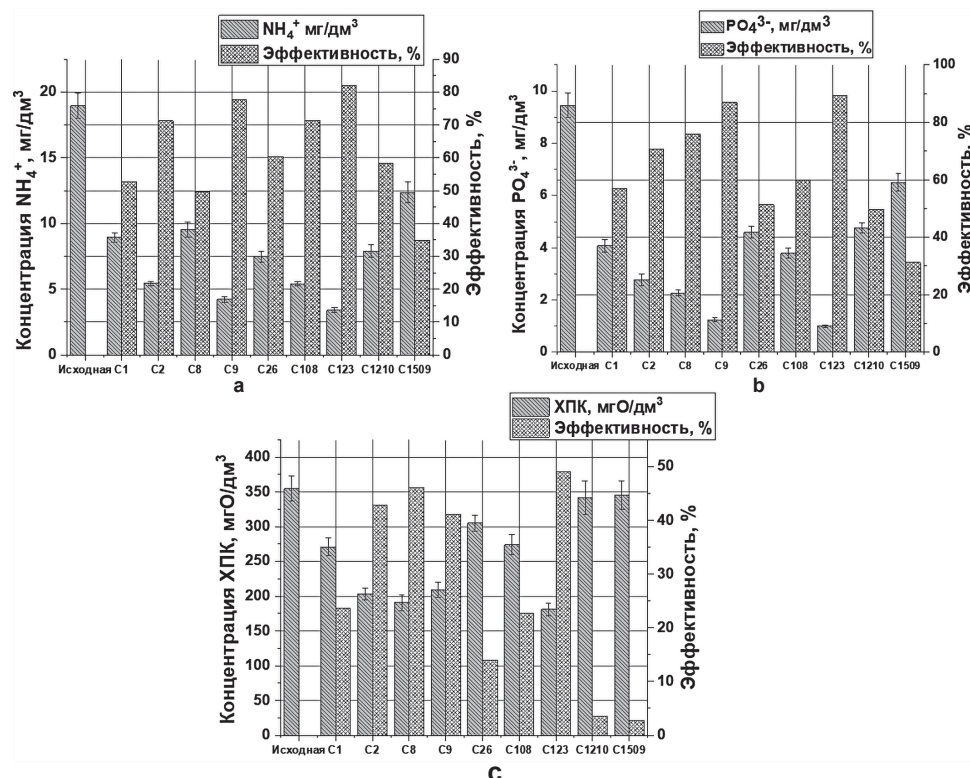


Рис. 2. Эффективность удаления загрязняющих веществ микроводорослями: а – NH_4^+ ; б – PO_4^{3-} ; в – химическое потребление кислорода

Fig. 2. Efficiency of pollutant removal by microalgae: а – NH_4^+ ; б – PO_4^{3-} ; в – chemical oxygen demand

Chlorella sp. IPPAS C-1210 усваивал только азот в виде аммония, так как эффективность удаления составляла 56%, а деструкция органических соединений по ХПК – только 7%, похожая ситуация наблюдалась и у культуры *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509. Степень удаления ХПК у остальных культур варьировала от 16 до 42%. Исходя из измерения показателя ХПК в водной фазе по истечении времени культивирования, можно сказать, что изучаемые микроводоросли имеют миксотрофный тип питания и способны усваивать как неорганический, так и органический субстрат.

Штамм *C. minutissima* IPPAS C-123 был самым активным по способности ассимилировать фосфат-ионы. За 7 суток культивирования концентрация с 9,4 мг/дм³ снизилась до 0,89 мг/дм³, эффективность дефосфотации составила 91%. Было зарегистрировано, что, помимо *C. minutissima* IPPAS C-123, штамм *P. kessleri* IPPAS C-9 не уступал в эффективности удаления фосфора из водной фазы (89%). Остальные изучаемые культуры по сравнению с *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123 потребляли фосфат-ионы менее активно. Возможно, это связано с тем, что культуры *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123 наиболее адаптированы к компонентам водной фазы гидротермального ожожения избыточного активного ила, о чем говорят высокие показатели прироста биомассы и скорости роста.

Исходя из проведенной серии экспериментов по периодическому культивированию микроводорослей на компонентах водной фазы и последующей регистрации изъятия загрязняющих веществ, были отмечены две культуры: *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123. Эти изоляты показали хорошую способность к росту и эффективно

удаляли основные загрязняющие вещества (NH_4^+ , PO_4^{3-} , ХПК), что свидетельствует об их высокой адаптационной способности к стрессовым факторам.

Состав биомассы микроводорослей. В научной литературе встречается большое количество исследований по очистке сточных вод микроводорослями с получением их биомассы и оценке содержания липидов, полисахаридов и белков, которые они накапливают в биомассе [9, 21], так как их биомассу можно использовать в качестве продуктов с добавленной стоимостью. Для этого дополнительно проводили эксперименты по оценке количественного состава биомассы культуры *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123 после их культивирования на водной фазе (рис. 3).

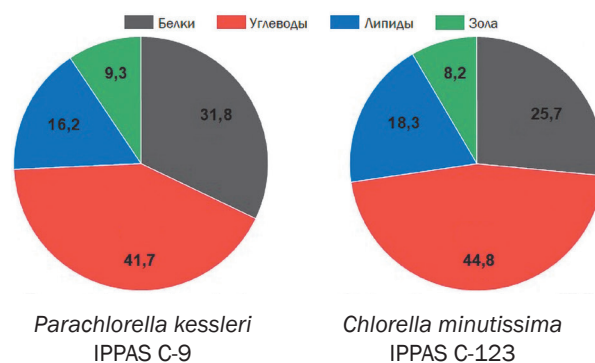


Рис. 3. Количественный состав биомассы изучаемых микроводорослей, %

Fig. 3. Quantitative composition of biomass of studied microalgae, %

Было отмечено, что большая часть биомассы водорослей состоит из полисахаридов – 41 и 44% (от общей массы) для культур *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123 соответственно. Изучаемые культуры в своем составе помимо полисахаридов имеют и довольно высокое содержание белков – до 30,7% (от общей массы), что дает возможность использовать их в качестве высококачественной кормовой добавки для аквакультуры [22]. Тем не менее было показано, что микроводоросли *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123 имеют низкое содержание липидов в своем составе – 16,2 и 18,3% соответственно. Вероятно, если в последующем их подвергать гидротермальному ожиганию, качество бионефти будет низким из-за невысокой концентрации липидной фракции [10]. Биомасса микроводорослей, предназначенная для производства биосырья через гидротермальное ожигание, в идеале должна содержать высокое количество липидов и низкое количество предшественников гетероатомов (белков и углеводов) [23], которые способствуют образованию биоугля. Содержание белка представляет собой еще одну проблему, поскольку азот-содержащие соединения требуют предварительной обработки по сравнению с производными углеводов, тем самым снижая качество биотоплива [24].

Известно, что липиды накапливаются в микроводорослях в значительных количествах в условиях азотного голодания [10]. Скорее всего, культивирование водорослей в течение длительного времени будет способствовать полному исчерпанию азота из водной фазы и приведет к большей концентрации липидной фракции в биомассе водорослей, однако длительное время культивирования нерентабельно, если говорить о процессе очистки сточных вод от загрязнителей.

Двухэтапная очистка водной фазы. Выращивание микроводорослей на водной фазе гидротермального

ожигания избыточного активного ила обеспечивает восстановление веществ из водной фазы в виде биомассы водорослей. В дальнейшем ее можно использовать в качестве сырья для производства биотоплива, но для этого необходимо высокое разведение исходной водной фазы, поскольку водоросли чувствительны к компонентам водной фазы [7, 10]. В отличие от микроводорослей аэробные культуры обладают более высокой устойчивостью к токсичным соединениям, поэтому интеграция этих двух методов биологической конверсии позволит повысить эффективность изъятия загрязнителей из водной фазы и уменьшить количество воды для разбавления [7].

Микроорганизмы *P. nicotinovorans* и *C. testosteroni* показали хорошую степень деструкции компонентов водной фазы и устойчивость к токсичным соединениям, которые они используют в качестве субстрата. По прошествии 48 ч культивирования бактериальных культур концентрация органических соединений снизилась с 2554,61 до 447,13 мгО/дм³, что соответствует эффективности 82%. Небольшой вклад бактерии внесли в удаление биогенных элементов – 22 и 27% по NH_4^+ и PO_4^{3-} соответственно. Низкие показатели по изъятию аммония можно объяснить тем, что изучаемые микроорганизмы не являются фосфат-аккумуляторами и у них отсутствуют ферменты для окисления аммония. Энергию для своего метаболизма они получают путем минерализации органических соединений, небольшое количество аммония и фосфатов нужно для построения белков и нуклеиновых кислот.

Культуры *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123 выращивали на водной фазе после бактериальной деструкции в течение 15 суток с измерением основных показателей удаления загрязняющих веществ. На рис. 4 показано изменение концентрации загрязнителей в водной фазе.

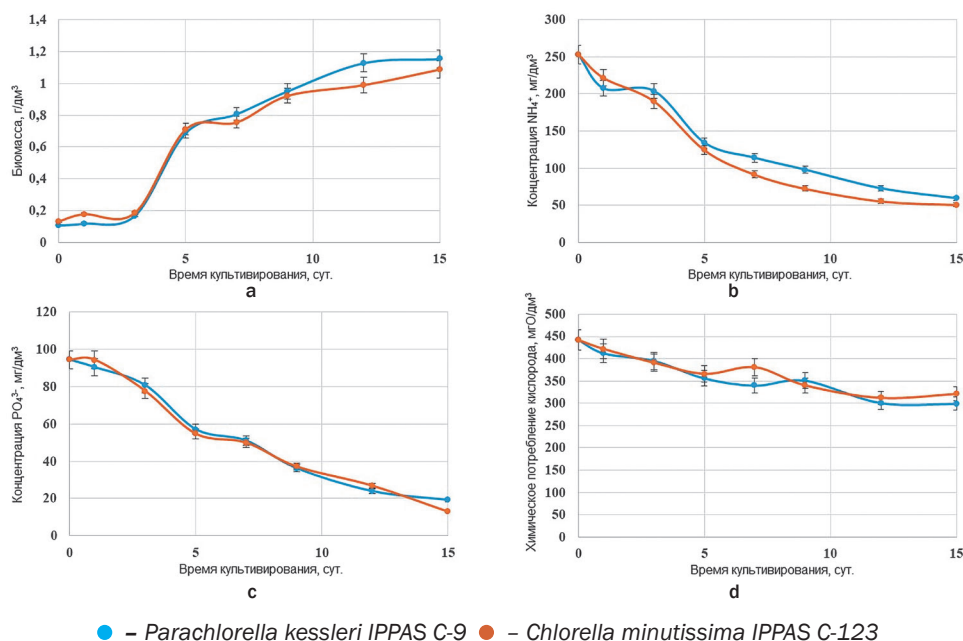


Рис. 4. Результаты обезвреживания водной фазы микроводорослями после бактериальной деструкции: а – прирост биомассы; б – NH_4^+ ; в – PO_4^{3-} ; д – химическое потребление кислорода

Fig. 4. Results of water phase neutralization by microalgae after bacterial degradation: а – biomass growth; б – NH_4^+ ; в – PO_4^{3-} ; д – chemical oxygen demand

В ходе периодического культивирования наблюдалось плавное снижение ионов аммония и фосфат-ионов у обеих культур. По истечении 15 суток культивирования концентрация NH_4^+ снизилась с 248 до 58 и 51 мг/дм^3 у культур *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123 соответственно. Потребление фосфатов было активнее, нежели на необработанной водной фазе, степень извлечения фосфора составляла до 86% для *C. minutissima* IPPAS C-123. Эффективность удаления органических соединений по ХПК была довольно низкой по сравнению с бактериальными культурами и составила 32 и 27% для штаммов *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123 соответственно.

Интересно то, что на водной фазе, которую частично минерализовали с помощью бактерий, увеличилось время выхода на стационарную фазу. По истечении 5 суток у обеих культур закончилась экспоненциальная фаза роста, но стационарная еще не наступила. Наблюдался медленный прирост, который продолжался в течение 10 суток. Общий прирост биомассы составил 1,04 и 1,23 г/дм^3 для *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123 соответственно, что на 30% больше, нежели на необработанной водной фазе.

Полученные экспериментальные результаты можно объяснить тем, что после обработки водной фазы бактериальными культурами концентрация органических соединений, подавляющих рост микроводорослей, снизилась и микроводоросли чувствовали себя комфортнее и были способны изъять большее количество неорганических поллютантов.

Таким образом, можно отметить, что последовательная очистка водной фазы с использованием микроорганизмов-деструкторов и микроводорослей эффективнее, нежели использование только бактерий или водорослей по отдельности. В результате такого подхода можно добиться практически полного удаления как органических соединений по ХПК, так и основных биогенных элементов (азота, фосфора).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования изучена способность микроводорослей использовать в качестве субстрата компоненты водной фазы гидротермального ожижения избыточного активного ила и оценены основные показатели культивирования. Показано, что штаммы *P. kessleri* IPPAS C-9, *C. zofingiensis* IPPAS C-108, *C. minutissima* IPPAS C-123 имели наиболее высокие скорости роста на изучаемом субстрате, однако по удалению загрязняющих соединений культуры *P. kessleri* IPPAS C-9 и *C. minutissima* IPPAS C-123 были эффективнее остальных.

Биомасса исследуемых культур микроводорослей отличалась большим содержанием полисахаридов и белков, но имела низкое содержание липидов. В связи с этим их избыточную биомассу в дальнейшем можно использовать в качестве кормовой добавки для аквакультур или для гидротермального ожижения с получением биоугля.

В ходе двухэтапной очистки водной фазы с использованием бактериальных культур и микроводорослей была достигнута высокая степень удаления органических и неорганических компонентов.

Таким образом, показано, что водная фаза процесса гидротермального ожижения избыточного активного ила может являться перспективным источником питательных веществ в процессах культивирования микроводорослей. Предварительная обработка водной фазы микробными культурами позволит увеличить выход биомассы водорослей и снизить количество воды для разбавления водной фазы с целью ее подготовки для культивирования. В результате использования данного подхода в дальнейшем можно повысить экономическую эффективность процесса гидротермального ожижения влажных органических отходов в целом.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Aktas K., Liu H., Eskicioglu C. Treatment of aqueous phase from hydrothermal liquefaction of municipal sludge by adsorption: comparison of biochar, hydrochar, and granular activated carbon // *Journal of Environmental Management*. 2024. Vol. 356. P. 120619. DOI: 10.1016/j.jenvman.2024.120619.
2. Basar I.A., Liu H., Eskicioglu C. Incorporating hydrothermal liquefaction into wastewater treatment – Part III: Aqueous phase characterization and evaluation of on-site treatment // *Chemical Engineering Journal*. 2023. Vol. 467. P. 143422. DOI: 10.1016/j.cej.2023.143422.
3. Liu H., Lyczko N., Nzihou A., Eskicioglu C. Incorporating hydrothermal liquefaction into wastewater treatment – Part II: Characterization, environmental impacts, and potential applications of hydrochar // *Journal of Cleaner Production*. 2023. Vol. 383. P. 135398. DOI: 10.1016/j.jclepro.2022.135398.
4. Liew C.S., Yunus N.M., Chidi B.S., Lam M.K., Goh P.S., Mohamad M., et al. A review on recent disposal of hazardous sewage sludge via anaerobic digestion and novel composting // *Journal of Hazardous Materials*. 2022. Vol. 423. P. 126995. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126995.
5. Yu J., Audu M., Myint M.T., Cheng F., Jarvis J.M., Jena U., et al. Bio-crude oil production and valorization of hydrochar as anode material from hydrothermal liquefaction of algae grown on brackish dairy wastewater // *Fuel Processing Technology*. 2022. Vol. 227. P. 107119. DOI: 10.1016/j.fuproc.2021.107119.
6. Leng L., Zhang W., Leng S., Chen J., Yang L., Li H., et al. Bioenergy recovery from wastewater produced by hydrothermal processing biomass: progress, challenges, and opportunities // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 748. P. 142383. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142383.
7. Watson J., Wang T., Si B., Chen W.-T., Aierzhati A., Zhang Y. Valorization of hydrothermal liquefaction aqueous phase: pathways towards commercial viability // *Progress in Energy and Combustion Science*. 2020. Vol. 77. P. 100819. DOI: 10.1016/j.pecs.2019.100819.
8. Yuan C., Zhao S., Ni J., He Y., Cao B., Hu Y. Integrated route of fast hydrothermal liquefaction of microalgae and sludge by recycling the waste aqueous phase for microalgal growth // *Fuel*. 2023. Vol. 334. P. 126488. DOI: 10.1016/j.fuel.2022.126488.
9. Chen L., Zhu T., Martinez Fernandez J.S., Chen S., Li D. Recycling nutrients from a sequential hydrothermal liquefaction process for microalgae culture // *Algal Research*. 2017. Vol. 27. P. 311–317. DOI: 10.1016/j.algal.2017.09.023.
10. Ramírez-Romero A., Martín M., Boyer A., Bolzoni R., Matricón L., Sassi J.-F., et al. Microalgae adaptation as a strategy to recycle the aqueous phase from hydrothermal

liquefaction // *Bioresource Technology*. 2023. Vol. 371. P. 128631. DOI: 10.1016/j.biortech.2023.128631.

11. Belete Y.Z., Leu S., Boussiba S., Zorin B., Posten C., Thomsen L., et al. Characterization and utilization of hydrothermal carbonization aqueous phase as nutrient source for microalgal growth // *Bioresource Technology*. 2019. Vol. 290. P. 121758. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121758.

12. Orfield N.D., Fang A.J., Valdez P.J., Nelson M.C., Savage P.E., Lin X.N., et al. Life cycle design of an algal biorefinery featuring hydrothermal liquefaction: effect of reaction conditions and an alternative pathway including microbial regrowth // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2014. Vol. 2, no. 4. P. 867–874. DOI: 10.1021/sc4004983.

13. Jayakody L.N., Johnson C.W., Whitham J.M., Giannone R.J., Black B.A., Cleveland N.S., et al. Thermochemical wastewater valorization via enhanced microbial toxicity tolerance // *Energy & Environmental Science*. 2018. Vol. 11, no. 6. P. 1625–1638. DOI: 10.1039/C8EE00460A.

14. Shende A., Nan W., Kodzomoyo E., Shannon J., Nicpon J., Shende R. Evaluation of aqueous product from hydrothermal liquefaction of cardboard as bacterial growth medium: co-liquefaction of cardboard and bacteria for higher bio-oil production // *Journal of Sustainable Bioenergy System*. 2017. Vol. 7, no. 2. P. 51–64. DOI: 10.4236/jsbs.2017.72005.

15. He Y., Li X., Xue X., Swita M.S., Schmidt A.J., Yang B. Biological conversion of the aqueous wastes from hydrothermal liquefaction of algae and pine wood by *Rhodococci* // *Bioresource Technology*. 2017. Vol. 224. P. 457–464. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.059.

16. Клементьев С.В., Сироткин А.С., Хасанова А.А., Куликова Ю.В. Обезвреживание компонентов водной фазы гидротермального ожигания избыточного активного ила в биосорбционных системах // *Бутлеровские сообщения*. 2024. Т. 77. № 3. С. 113–121. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/24-77-3-113. EDN: HIZMCU.

17. Синетова М.А., Сидоров Р.А., Стариков А.Ю., Воронков А.С., Медведева А.С., Кривова З.В. [и др.]. Характеристика биотехнологического потенциала штаммов цианобактерий и микроводорослей кол-

лекции IPPAS // *Биотехнология*. 2019. Т. 35. N 3. С. 12–29. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-12-29. EDN: HVYVGM.

18. Pérez-Rodríguez S., Ramírez O.T., Trujillo-Roldán M.A., Valdez-Cruz N.A. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis of Chinese hamster ovary cell homogenates // *Electronic Journal of Biotechnology*. 2020. Vol. 48. P. 86–94. DOI: 10.1016/j.ejbt.2020.09.006.

19. Leyva A., Quintana A., Sánchez M., Rodríguez E.N., Cremata J., Sánchez J.C. Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: method development and validation // *Biological*. 2008. Vol. 36, no. 2. P. 134–141. DOI: 10.1016/j.biologicals.2007.09.001.

20. SundarRajan P., Gopinath K.P., Arun J., Grace-Pavithra K., Adithya Joseph A., Manasa S. Insights into valuing the aqueous phase derived from hydrothermal liquefaction // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2021. Vol. 144. P. 111019. DOI: 10.1016/j.rser.2021.111019.

21. Parsy A., Monlau F., Guyoneaud R., Sambusiti C. Nutrient recovery in effluents from the energy sectors for microalgae and cyanobacteria biomass production: a review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2024. Vol. 191. P. 114207. DOI: 10.1016/j.rser.2023.114207.

22. Hasan M.R., Chakrabarti R. Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: a review. Rome: Food AND Agriculture Organization of the United Nations, 2009. 135 p.

23. Ratha S.K., Renuka N., Abunama T., Rawat I., Bux F. Hydrothermal liquefaction of algal feedstocks: the effect of biomass characteristics and extraction solvents // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2022. Vol. 156. P. 111973. DOI: 10.1016/j.rser.2021.111973.

24. Haider M.S., Castello D., Rosendahl L.A. Two-stage catalytic hydrotreatment of highly nitrogenous biocrude from continuous hydrothermal liquefaction: a rational design of the stabilization stage // *Biomass and Bioenergy*. 2020. Vol. 139. P. 105658 DOI: 10.1016/j.biombioe.2020.105658.

REFERENCES

1. Aktas K., Liu H., Eskicioglu C. Treatment of aqueous phase from hydrothermal liquefaction of municipal sludge by adsorption: comparison of biochar, hydrochar, and granular activated carbon. *Journal of Environmental Management*. 2024;356:120619. DOI: 10.1016/j.jenvman.2024.120619.

2. Basar I.A., Liu H., Eskicioglu C. Incorporating hydrothermal liquefaction into wastewater treatment – Part III: Aqueous phase characterization and evaluation of on-site treatment. *Chemical Engineering Journal*. 2023;467:143422. DOI: 10.1016/j.cej.2023.143422.

3. Liu H., Lyczko N., Nzihou A., Eskicioglu C. Incorporating hydrothermal liquefaction into wastewater treatment – Part II: Characterization, environmental impacts, and potential applications of hydrochar. *Journal of Cleaner Production*. 2023;383:135398. DOI: 10.1016/j.jclepro.2022.135398.

4. Liew C.S., Yunus N.M., Chidi B.S., Lam M.K., Goh P.S., Mohamad M., et al. A review on recent disposal of hazardous sewage sludge via anaerobic digestion and novel composting. *Journal of Hazardous Materials*. 2022;423:126995. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126995.

5. Yu J., Audu M., Myint M.T., Cheng F., Jarvis J.M., Jena U., et al. Bio-crude oil production and valorization of hydrochar as anode material from hydrothermal liquefaction of algae grown on brackish dairy wastewater. *Fuel Processing Technology*. 2022;227:107119. DOI: 10.1016/j.fuproc.2021.107119.

6. Leng L., Zhang W., Leng S., Chen J., Yang L., Li H., et al. Bioenergy recovery from wastewater produced by hydrothermal processing biomass: progress, challenges, and opportunities. *Science of the Total Environment*. 2020;748:142383. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142383.

7. Watson J., Wang T., Si B., Chen W.-T., Aierzhati A., Zhang Y. Valorization of hydrothermal liquefaction aqueous phase: pathways towards commercial viability. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2020;77:100819. DOI: 10.1016/j.pecs.2019.100819.

8. Yuan C., Zhao S., Ni J., He Y., Cao B., Hu Y. Integrated route of fast hydrothermal liquefaction of microalgae and sludge by recycling the waste aqueous phase for microalgal growth. *Fuel*. 2023;334:126488. DOI: 10.1016/j.fuel.2022.126488.

9. Chen L., Zhu T., Martinez Fernandez J.S., Chen S., Li D. Recycling nutrients from a sequential hydrothermal liquefaction process for microalgae culture. *Algal Research*. 2017;27:311-317. DOI: 10.1016/j.algal.2017.09.023.
10. Ramírez-Romero A., Martín M., Boyer A., Bolzoni R., Matricón L., Sassi J.-F., et al. Microalgae adaptation as a strategy to recycle the aqueous phase from hydrothermal liquefaction. *Bioresource Technology*. 2023;371:128631. DOI: 10.1016/j.biortech.2023.128631.
11. Belete Y.Z., Leu S., Boussiba S., Zorin B., Posten C., Thomsen L., et al. Characterization and utilization of hydrothermal carbonization aqueous phase as nutrient source for microalgal growth. *Bioresource Technology*. 2019;290:121758. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121758.
12. Orfield N.D., Fang A.J., Valdez P.J., Nelson M.C., Savage P.E., Lin X.N., et al. Life cycle design of an algal biorefinery featuring hydrothermal liquefaction: effect of reaction conditions and an alternative pathway including microbial regrowth. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2014;2(4):867-874. DOI: 10.1021/sc4004983.
13. Jayakody L.N., Johnson C.W., Whitham J.M., Giannone R.J., Black B.A., Cleveland N.S., et al. Thermochemical wastewater valorization via enhanced microbial toxicity tolerance. *Energy & Environmental Science*. 2018;11(6):1625-1638. DOI: 10.1039/C8EE00460A.
14. Shende A., Nan W., Kodzomoyo E., Shannon J., Nicpon J., Shende R. Evaluation of aqueous product from hydrothermal liquefaction of cardboard as bacterial growth medium: co-liquefaction of cardboard and bacteria for higher bio-oil production. *Journal of Sustainable Bioenergy System*. 2017;7(2):51-64. DOI: 10.4236/jsbs.2017.72005.
15. He Y., Li X., Xue X., Swita M.S., Schmidt A.J., Yang B. Biological conversion of the aqueous wastes from hydrothermal liquefaction of algae and pine wood by *Rhodococci*. *Bioresource Technology*. 2017;224:457-464. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.059.
16. Klementiev S.V., Sirotkin A.S., Khasanova A.A., Kulikova Yu.V. Decontamination of aqueous phase components of hydrothermal liquefaction of excess activated sludge in biosorption systems. *Butlerov Communications*. 2024;77(3):113-121. (In Russian). DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/24-77-3-113. EDN: HIZMCU.
17. Sinetova M.A., Sidorov R.A., Starikov A.Yu., Voronkov A.S., Medvedeva A.S., Krivova Z.V., et al. Assessment of biotechnological potential of cyanobacteria and microalgae strains from IPPAS culture collection. *Biotehnologiya*. 2019;35(3):12-19. (In Russian). DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-12-29.
18. Pérez-Rodríguez S., Ramírez O.T., Trujillo-Roldán M.A., Valdez-Cruz N.A. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis of Chinese hamster ovary cell homogenates. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2020;48:86-94. DOI: 10.1016/j.ejbt.2020.09.006.
19. Leyva A., Quintana A., Sánchez M., Rodríguez E.N., Cremata J., Sánchez J.C. Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: method development and validation. *Biological*. 2008;36(2):134-141. DOI: 10.1016/j.biologicals.2007.09.001.
20. Sundarajan P., Gopinath K.P., Arun J., Grace-Pavithra K., Adithya Joseph A., Manasa S. Insights into valuing the aqueous phase derived from hydrothermal liquefaction. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2021;144:111019. DOI: 10.1016/j.rser.2021.111019.
21. Parsy A., Monlau F., Guyoneaud R., Sambusiti C. Nutrient recovery in effluents from the energy sectors for microalgae and cyanobacteria biomass production: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2024;191:114207. DOI: 10.1016/j.rser.2023.114207.
22. Hasan M.R., Chakrabarti R. Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: a review. Rome: Food AND Agriculture Organization of the United Nations; 2009, 135 p.
23. Ratha S.K., Renuka N., Abunama T., Rawat I., Bux F. Hydrothermal liquefaction of algal feedstocks: the effect of biomass characteristics and extraction solvents. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2022;156:111973. DOI: 10.1016/j.rser.2021.111973.
24. Haider M.S., Castello D., Rosendahl L.A. Two-stage catalytic hydrotreatment of highly nitrogenous biocrude from continuous hydrothermal liquefaction: a rational design of the stabilization stage. *Biomass and Bioenergy*. 2020;139:105658 DOI: 10.1016/j.biombioe.2020.105658.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Клементьев Святослав Владимирович, аспирант, Казанский национальный исследовательский технологический университет, 420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68, Российская Федерация, ✉slava_klementev3715@mail.ru <https://orcid.org/0000-0001-5459-974X>

Буденкова Екатерина Александровна, к.т.н., младший научный сотрудник, Балтийский федеральный университет им. И. Канта, 236041, г. Калининград, ул. Университетская, 2, Российская Федерация, KBudenkova@gmail.com <https://orcid.org/0000-0003-4854-5459>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Svyatoslav V. Klementev, Postgraduate Student, Kazan National Research Technological University, 68, Karl Marx St., Kazan, 420015, Russian Federation, ✉slava_klementev3715@mail.ru <https://orcid.org/0000-0001-5459-974X>

Ekaterina A. Budenkova, Cand. Sci. (Engineering), Junior Researcher, Immanuel Kant Baltic Federal University, 2, University St., Kaliningrad, 236041, Russian Federation, KBudenkova@gmail.com <https://orcid.org/0000-0003-4854-5459>

Куликова Юлия Владимировна,
к.т.н., старший научный сотрудник,
Балтийский федеральный
университет им. И. Канта,
236041, г. Калининград, ул. Университетская, 2,
Российская Федерация,
kulikova.pnpu@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0896-4571>

Yulia V. Kulikova,
Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher,
Immanuel Kant Baltic Federal University,
2, University St., Kaliningrad, 236041,
Russian Federation,
kulikova.pnpu@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0896-4571>

Сироткин Александр Семенович,
д.т.н., профессор, заведующий кафедрой,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
asirotkin66@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4480-9907>

Alexander S. Sirotkin,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Head of the Department,
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
asirotkin66@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4480-9907>

Вклад авторов

С.В. Клементьев – проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов, написание текста статьи.
Е.А. Буденкова – проведение экспериментов, обсуждение полученных данных.
Ю.В. Куликова – разработка концепции исследования, развитие методологии, обсуждение результатов.
А.С. Сироткин – разработка концепции исследования, развитие методологии, обсуждение результатов, редактирование текста статьи.

Contribution of the authors

Svyatoslav V. Klementev – conducting experiments, data processing, results discussion, preparing the text of manuscript.
Ekaterina A. Budenkova – conducting experiments, data processing, results discussion.
Yulia V. Kulikova – research concept and methodology development, results discussion.
Alexander S. Sirotkin – research concept and methodology development, results discussion, editing the manuscript.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict interests

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

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

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

Информация о статье

Поступила в редакцию 17.07.2024.
Одобрена после рецензирования 16.09.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

Information about the article

The article was submitted 17.07.2024.
Approved after reviewing 16.09.2024.
Accepted for publication 30.11.2024.



Динамика концентрации нафталина в водной среде в присутствии *Bacillus megaterium*

С.А. Коваленко*, А.Б. Купчинский*, Д.И. Стом*****✉

*Байкальский музей СО РАН, Листвянка, Российская Федерация

**Сургутский государственный университет, Сургут, Россия

***Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

****Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск, Россия

Аннотация. Изучили экспериментально динамику концентрации нафталина с исходным содержанием 1, 2 и 3 г/л в синтетической сточной воде. Начальное число клеток *Bacillus megaterium* МК64-1 в среде составило $1,7 \times 10^7$ КОЕ/мл. На 1-е сутки опыта концентрация нафталина снизилась до сотых долей грамма, при этом количество микроорганизмов увеличилось до 10^9 КОЕ/мл (в вариантах с начальным количеством нафталина 1 и 2 г/л) и до 10^{11} КОЕ/мл (в вариантах со стартовым количеством нафталина 3 г/л). За 14 суток значение pH среды как в опытных, так и в контрольном вариантах с добавлением суспензии микроорганизмов снизилось в среднем на 0,7 ед. (с 8,56 до 7,86). За это время величина редокс-потенциала среды в опытных вариантах увеличилась в среднем на 70 мВ. Выявлена весьма тесная прямая корреляция ($p < 0,05$) между исходной концентрацией и количеством деградированного бактериями поллютанта. Определение дегидрогеназной активности *Bacillus megaterium* двумя методами (с 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом и с метиленовым синим), а также определение чувствительности микроорганизмов к концентрациям углеводорода 1, 2 и 3 г/л диско-диффузионным методом показали отсутствие токсического действия исследуемых концентраций поллютанта на бактерии в условиях опыта. Результаты экспериментальной работы позволяют сделать вывод о способности штамма *Bacillus megaterium* МК64-1 к биодеструкции нафталина.

Ключевые слова: *Bacillus megaterium*, биodeградация, нафталин, кислотность, редокс-потенциал, токсичность, сточная вода

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Департамента образования и науки Ханты-Мансийского автономного округа – Югры в рамках научного проекта № 2023-227-05.

Для цитирования: Коваленко С.А., Купчинский А.Б., Стом Д.И. Динамика концентрации нафталина в водной среде в присутствии *Bacillus megaterium* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 548–555. DOI: 10.21285/achb.950. EDN: XFPEVA.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Naphthalene concentration dynamics in an aqueous medium in the presence of *Bacillus megaterium*

Svetlana A. Kovalenko*, Alexander B. Kupchinsky*, Devard I. Stom*****✉

*Baikal Museum SB RAS, Listvyanka, Russian Federation

**Surgut State University, Surgut, Russian Federation

***Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

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

Abstract. The study examined the concentration dynamics of naphthalene, with its initial concentrations of 1, 2, and 3 g/L in synthetic wastewater. The initial number of *Bacillus megaterium* MK64-1 cells in the medium amounted

to 1.7×10^7 CFU/mL. On day 14 of the experiment, the concentration of naphthalene decreased to hundredths of a gram, while the microbial count increased to 10^9 CFU/mL (at the initial naphthalene concentrations of 1 and 2 g/L) and 10^{11} CFU/mL (at the initial naphthalene concentration of 3 g/L). After 14 days, the medium pH decreased by an average of 0.7 units (from 8.56 to 7.86) in both test and control media, with the addition of a microbial suspension. During this time, the redox potential of the medium increased by an average of 70 mV in the test media. Quite a strong direct correlation ($p < 0.05$) was found between the initial concentration and the amount of pollutant degraded by bacteria. The determination of dehydrogenase activity in *Bacillus megaterium* by means of two methods (with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride and methylene blue), as well as microbial sensitivity to hydrocarbon concentrations of 1, 2, and 3 g/L via the disk-diffusion method, showed no toxic effect of the analyzed pollutant concentrations on bacteria under the experimental conditions. The obtained results indicate the ability of *Bacillus megaterium* strain MK64-1 to biodegrade naphthalene.

Keywords: *Bacillus megaterium*, biodegradation, naphthalene, acidity, redox potential, toxicity, wastewater

Funding. The Department of Education and Science of Khanty-Mansi Autonomous Okrug – Yugra supported this work (Grant no. 2023-227-05).

For citation: Kovalenko S.A., Kupchinsky A.B., Stom D.I. Naphthalene concentration dynamics in an aqueous medium in the presence of *Bacillus megaterium*. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):548-555. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.950. EDN: XFPEVA.

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня антропогенное загрязнение окружающей среды достигло уровня, способного вызывать необратимые изменения в биосфере [1, 2]. В водной среде все более возрастает количество самых различных загрязнителей [3]. Потенциальная токсичность, канцерогенность, тератогенность, мутагенность, способность к сорбции и кумуляции, химическая устойчивость полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) делают эту группу веществ особенно опасной [4–6]. Основными источниками загрязнения экосистем ПАУ являются предприятия, использующие в производственном цикле термическую обработку органического сырья [7, 8]. Нафталин – широко распространенный загрязнитель, простейший представитель класса ПАУ. Агентством по охране окружающей среды США (англ.: United States Environmental Protection Agency) нафталин отнесен к приоритетным загрязнителям к группе возможно канцерогенных для человека [9–11]. Известен ряд методов для удаления ПАУ из окружающей среды [12–14]. Особенно большой интерес вызывает технология биологической деструкции ПАУ, основанная на использовании способности микроорганизмов и растений использовать загрязнители в качестве источников углерода и энергии [15, 16]. В разрушении ароматических углеводородов важную роль играют различные виды бактерий, грибов, цианобактерий [14, 17, 18]. Сообщений об использовании *Bacillus megaterium* MK64-1 в качестве биодеструктора нафталина нами в литературных источниках не найдено.

Цель данной работы – оценка способности штамма *B. megaterium* MK64-1 к деструкции нафталина в водной среде.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали штамм *B. megaterium* MK64-1 (MK64-1«R»). Штамм депонирован в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика (регистрационный номер В-7998). Культивирование *B. megaterium* проводили на мясепептонном агаре.

Постановку эксперимента выполняли в асептических условиях. Для опыта использовали суспензию бактерий в синтетической сточной воде (ССВ)¹. Начальная концентрация 3-суточной культуры микроорганизмов в среде составила 1.7×10^7 КОЕ/мл. Единственным источником углерода и энергии в ССВ служил нафталин (99%, Acros Organics, Fisher Scientific, Чешская Республика) в количестве 1, 2 и 3 г/л. Среды стерилизовали насыщенным паром под давлением 1 атм. при 121 °С в течение 20 мин. В пробирки вносили по 0,1, 0,2 или 0,3 мл 10%-го раствора нафталина в ацетонитриле. После полного испарения растворителя добавляли по 10 мл суспензии *B. megaterium* в ССВ в каждую пробирку, получая тем самым растворы с рабочими концентрациями нафталина. Пробирки закрывали герметично, максимально вытеснив избыток жидкости. В качестве контрольных вариантов использовали суспензию *B. megaterium* без органического субстрата и растворы нафталина в ССВ. Культуральную жидкость в пробирках инкубировали при 30 °С. Параметры системы определяли в начале опыта, на 4-е и 14-е сутки эксперимента.

Водородный показатель (рН) и редокс-потенциал среды измеряли с помощью рН-метра рН-150МИ с комбинированными стеклянными электродами ЭСК-10601/7 (рН-электрод) и ЭРП-105 (редокс-электрод).

Учет общего микробного числа (ОМЧ) проводили методом Коха.

Концентрацию нафталина определяли с помощью системы высокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent серии 1200 (Agilent Technologies, США) с диодноматричным детектором на длинах волн 210 и 220 нм. Экстракцию нафталина из пробы осуществляли гексаном. Разделение проводили на колонке Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Analytical (250×4,6 мм, 5 мкм). Анализ выполняли в системе 10% вода – 90% ацетонитрил. Скорость элюирования – 1 мл/мин. Температура хроматографирования – 40 °С.

О токсичности нафталина в диапазоне концентраций от 1 до 3 г/л в отношении *B. megaterium* судили по уровню дегидрогеназной активности бактерий. Исполь-

¹ ГОСТ Р 50595-93. Вещества поверхностно-активные. Метод определения биоразлагаемости в водной среде. М.: Издательство стандартов, 1994. 42 с.

зовали реактивы 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид² и метиленовый синий³.

Для оценки чувствительности штамма к исследуемым концентрациям ПАУ применили диско-диффузионный метод⁴.

Все опыты ставили в пяти биологических и не менее чем в трех аналитических повторностях.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерных программ Past 3 и Microsoft Excel 2016. Достоверность данных определяли по критерию Стьюдента с уровнем значимости $p < 0,05$. Для выявления и количественной оценки зависимостей между параметрами системы использовали корреляционно-регрессионный анализ [19]. Результаты представлены в виде средних арифметических величин и их стандартных отклонений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

О способности бактерий *B. megaterium* к биодegradации нафталина судили по изменению концентрации ПАУ в ССВ в течение 4 дней. Также определили его количество на 14-е сутки опыта.

За двухнедельный период наблюдений отмечено снижение значения pH среды во всех вариантах с *B. megaterium* в среднем на 0,7 ед. (рис. 1, а).

На 4-е сутки эксперимента редокс-потенциал среды в опытных вариантах уменьшился в среднем на 14,0 мВ от исходного значения (рис. 1, б). На 14-е сутки значение показателя превышало исходное на 40%.

В контрольном варианте (без субстрата) редокс-потенциал среды на 14-е сутки практически не изменился. В контрольных вариантах с нафталином, где суспензию бактерий не добавляли, существенных колебаний кислотности и редокс-потенциала среды не зафиксировано, концентрация нафталина во время наблюдений оставалась на исходном уровне.

На 4-е сутки эксперимента в опытных вариантах нафталин выявлен в количестве от 40 мг/л (в варианте с исходной концентрацией ПАУ 1 г/л) до 110 мг/л (в варианте с начальной концентрацией ПАУ 3 г/л) (рис. 2). На 14-е сутки концентрация нафталина опытных вариантов с исходным количеством загрязнителя 1, 2 и 3 г/л составила 15, 48 и 63 мг/л соответственно.

На 4-е сутки эксперимента ОМЧ опытных вариантов со стартовыми концентрациями 1 и 2 г/л нафталина выше, чем ОМЧ контрольного варианта, на 32 и 114% соответственно. На 14-е сутки ОМЧ несколько снижается, но значение – выше исходного в 420 и 470 раз соответственно (табл. 1). ОМЧ варианта с 3 г/л нафталина к четвертому дню опыта возросло в 3,5 раза от исходного, что ниже ОМЧ контрольного варианта на 100%. К 14-м суткам ОМЧ увеличилось в 8800 раз от исходного, что выше ОМЧ контрольного варианта в 38 раз.

Корреляция между динамикой ОМЧ и исходной концентрацией нафталина, а также между динамикой ОМЧ и количеством усвоенного бактериями нафталина статистически не подтверждена ($p < 0,05$) (табл. 2).

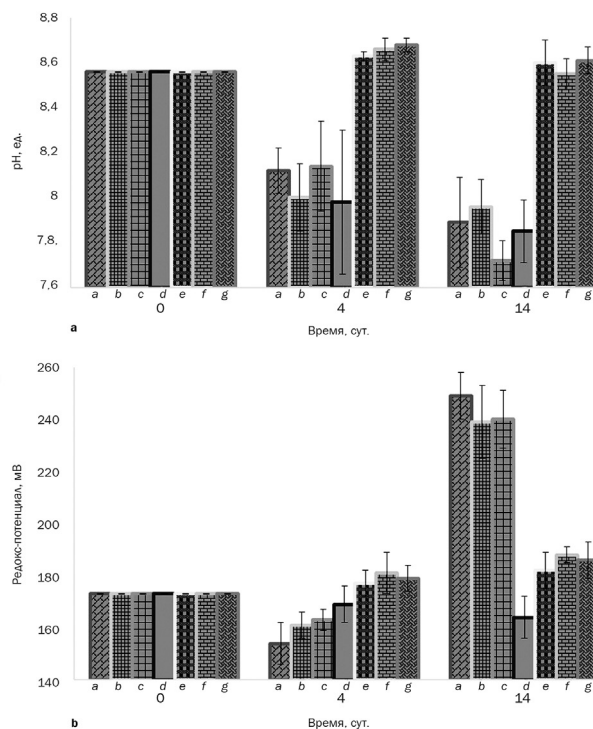


Рис. 1. Динамика активной кислотности (а) и редокс-потенциала (б) культуральной жидкости *Bacillus megaterium* (среда – синтетическая сточная вода, органический субстрат – нафталин): а – *Bacillus megaterium* + 1 г/л нафталина; б – *Bacillus megaterium* + 2 г/л нафталина; с – *Bacillus megaterium* + 3 г/л нафталина; д – *Bacillus megaterium*; е – 1 г/л нафталина; ф – 2 г/л нафталина; г – 3 г/л нафталина

Fig. 1. Dynamics of active acidity (a) and redox potential (b) of the culture liquid of *Bacillus megaterium* (medium – synthetic waste water, organic substrate – naphthalene): а – *Bacillus megaterium* + 1 g/l naphthalene; б – *Bacillus megaterium* + 2 g/l naphthalene; с – *Bacillus megaterium* + 3 g/l naphthalene; д – *Bacillus megaterium*; е – 1 g/l naphthalene; ф – 2 g/l naphthalene; г – 3 g/l naphthalene

Весьма тесная прямая корреляция между исходной концентрацией и количеством усвоенного бактериями нафталина выявлена как на 4-е, так и на 14-е сутки опыта ($p < 0,05$). Ошибка аппроксимации данной зависимости близка к 0%, что говорит о высоком уровне соответствия эмпирической и расчетной модели регрессии на 4-е и 14-е сутки опыта.

Снижение pH можно рассматривать как признак активного выделения бактериями кислых метаболитов. Например, группой исследователей Санкт-Петербургского государственного аграрного университета при секвенировании ДНК штамма *B. megaterium* В-4801 выявлены гены, ответственные за продукцию ряда органических

² МУК 4.2.026-95. Экспресс-метод определения антибиотиков в пищевых продуктах. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 1995. 14 с.

³ Инструкция по лабораторному контролю очистных сооружений на животноводческих комплексах. Часть III. Определение биогенных веществ. Анализ осадков и ила. Утв. 17.11.1980.

⁴ МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с.

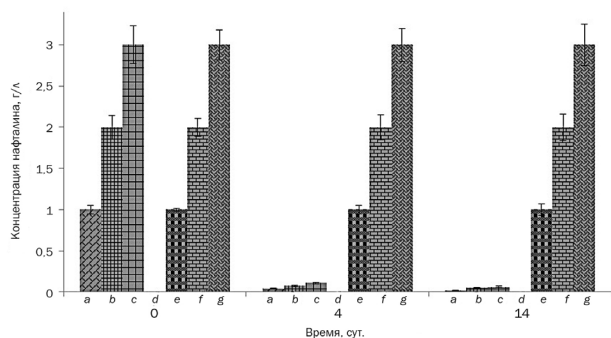


Рис. 2. Динамика концентрации нафталина в среде (среда – синтетическая сточная вода, органический субстрат – нафталин, биоагент – *Bacillus megaterium*):
а – *Bacillus megaterium* + 1 г/л нафталина;
б – *Bacillus megaterium* + 2 г/л нафталина;
с – *Bacillus megaterium* + 3 г/л нафталина;
д – *Bacillus megaterium*; е – 1 г/л нафталина;
ф – 2 г/л нафталина; г – 3 г/л нафталина

Fig. 2. Dynamics of naphthalene concentration in the medium (medium – synthetic waste water, organic substrate – naphthalene, bioagent – *Bacillus megaterium*):

а – *Bacillus megaterium* + 1 g/l naphthalene;
б – *Bacillus megaterium* + 2 g/l naphthalene;
с – *Bacillus megaterium* + 3 g/l naphthalene;
д – *Bacillus megaterium*; е – 1 g/l naphthalene;
ф – 2 g/l naphthalene; г – 3 g/l naphthalene

кислот (пальмитиновой, масляной, капроновой и др.) [20]. Наличие нафталина в среде и его концентрация в пределах от 1 до 3 г/л существенно не влияют на динамику рН ($p < 0,05$). Динамика редокс-потенциала

среды говорит об активном биологическом окислении нафталина с накоплением в питательной среде промежуточных метаболитов – скорее всего, производных органических кислот, способных выступать в роли восстановителей. К 14-м суткам опыта возрастает интенсивность расщепления интермедиатов.

Прослеживается аналогия с данными, полученными А. Тарафдаром с соавторами [18]. В процессе эксперимента они отметили способность генетически родственного вида *Bacillus thuringiensis* к биodeградации антрацена (снижение концентрации загрязнителя в течение 14 суток с 40,0 до 3,6 мг/л, сопровождающееся ростом биомассы). В нашей работе зафиксировано удаление нафталина из среды и увеличение количества клеток *B. megaterium*. В опытах Ч. Линь и др. [13] показана способность *Bacillus fusiformis* утилизировать более 90% нафталина за 4 дня при начальной концентрации ПАУ в среде 50 мг/л, так же, как и в нашей работе, зарегистрировано снижение рН среды на единицу.

Результаты анализа полученных данных (задержка роста биомассы бактериальных клеток с последующим скачком на фоне активного снижения содержания загрязнителя в среде, отсутствие корреляции между ОМЧ и количеством ПАУ) позволили предположить, что нафталин в концентрации 3 г/л, а также его интермедиаты могут оказывать некоторое токсическое действие на *B. megaterium* МК64-1. Токсичность ПАУ могла проявиться в стрессовом ускорении его деградации микроорганизмом. Похожий вывод при работе с *B. fusiformis* сделал и Ч. Линь с соавторами [10, 13]. Возможно, динамика концентрации субстрата послужила причиной медленного роста числа клеток в начале опыта в варианте с 3 г/л нафталина и резкого роста ОМЧ к 14-м суткам.

Таблица 1. Динамика микробного числа штамма *Bacillus megaterium* МК64-1 в синтетической сточной воде в присутствии нафталина, КОЕ/мл

Table 1. Dynamics of the microbial number of *Bacillus megaterium* МК64-1 in synthetic wastewater in the presence of naphthalene, CFU/ml

Продолжительность, сут.	Контрольный опыт без нафталина	Концентрация нафталина, г/л		
		1	2	3
0	$1,7 \times 10^7 \pm 9,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^7 \pm 9,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^7 \pm 9,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^7 \pm 9,7 \times 10^5$
4	$5,6 \times 10^9 \pm 2,1 \times 10^8$	$7,4 \times 10^9 \pm 3,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^{10} \pm 4,0 \times 10^8$	$5,8 \times 10^7 \pm 4,2 \times 10^6$
14	$3,9 \times 10^9 \pm 1,4 \times 10^8$	$7,2 \times 10^9 \pm 3,0 \times 10^8$	$8,0 \times 10^9 \pm 2,8 \times 10^7$	$1,5 \times 10^{11} \pm 2,2 \times 10^{10}$

Таблица 2. Статистические параметры зависимостей между динамикой микробного числа штамма *Bacillus megaterium* МК64-1, исходной концентрацией нафталина и количеством деградированного бактериями нафталина в водной среде

Table 2. Statistical parameters of the relationships between the dynamics of the microbial number of *Bacillus megaterium* МК64-1, the initial concentration of naphthalene and the amount of naphthalene degraded by bacteria in aqueous medium

Зависимость показателей	Продолжительность, сут.	Уравнение зависимости	Коэффициент детерминации, %	Ошибка аппроксимации, %
Исходная концентрация нафталина – Микробное число <i>Bacillus megaterium</i>	4	$y = -10^9 x + 8 \times 10^9$	9,89	480,92
	14	$y = 4 \times 10^{10} x - 2 \times 10^{10}$	62,27	101,17
Микробное число <i>Bacillus megaterium</i> – Количество деградированного бактериями нафталина	4	$y = -10^{-10} x + 2,5580$	37,03	14,55
	14	$y = 10^{-11} x + 1,3886$	75,88	8,14
Исходная концентрация нафталина – Количество деградированного бактериями нафталина	4	$y = 0,9637x - 0,0013$	99,99	0,02
	14	$y = 0,9778x + 0,0018$	99,99	0,08

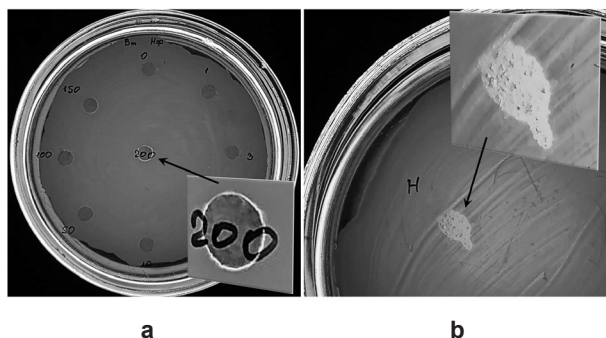


Рис. 3. Определение чувствительности *Bacillus megaterium* к нафталину диско-диффузионным методом:
а – концентрации до 200 г/л нафталина;
б – порошок нафталина (99%)

Fig. 3. Determination of *Bacillus megaterium* sensitivity to naphthalene by the disk-diffusion method:
а – concentrations up to 200 g/l of naphthalene;
б – powder of naphthalene (99%)

При определении дегидрогеназной активности *B. megaterium* как методом с 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом, так и методом с метиленовым синим, изменение показателей активности фермента опытных вариантов относительно контрольного не существенно в

вариантах с начальным количеством загрязнителя 1 и 2 г/л, а в варианте с начальным количеством загрязнителя 3 г/л составило 15% (с метиленовым синим) и 21% (с 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом) в сторону усиления активности дегидрогеназы.

При тестировании концентраций нафталина 1, 2 и 3 г/л диско-диффузионным методом чувствительность к ним *B. megaterium* в условиях опыта не выявлена (рис. 3). При непосредственном контакте бактериальных клеток с порошком нафталина (99%) наблюдали появление зоны задержки роста колоний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов установлена способность бактерий *B. megaterium* к биодеструкции нафталина. Содержание данного ПАУ в водной среде в диапазоне начальных концентраций 1–3 г/л за 14 дней снизилось до сотых долей грамма на фоне увеличения количества микроорганизмов в 100–8800 раз. При тестировании *B. megaterium* на чувствительность к загрязнителю и определении дегидрогеназной активности бактерий в присутствии ПАУ токсическое действие исследуемых концентраций нафталина в отношении штамма *B. megaterium* МК64-1 в условиях опыта не выявлено.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Basumatary T., Parthipan P., Sarma H. Microbial contributions in restoring degraded biosphere habitats: comparing natural and engineered approaches // *Biotechnology of Emerging Microbes. Prospects for Agriculture and Environment* / eds H. Sarma, S.J. Joshi. Elsevier, 2024. P. 107–125. DOI: 10.1016/B978-0-443-15397-6.00008-5.
- Edo G.I., Itoje-akpokiniyo L.O., Obasohan P., Ikpekor V.O., Samuel P.O., Jikahet A.N., et al. Impact of environmental pollution from human activities on water, air quality and climate change // *Ecological Frontiers*. 2024. Vol. 44, no. 5. P. 874–889. DOI: 10.1016/j.ecofro.2024.02.014.
- Yi Y., Xie B., Zhao T., Li Z., Stom D., Liu H. Effect of external resistance on the sensitivity of microbial fuel cell biosensor for detection of different types of pollutants // *Bioelectrochemistry*. 2019. Vol. 125. P. 71–78. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2018.09.003.
- Кузьмин В.В., Болдырев К.А. Гидрохимическое моделирование миграции растворенных нефтепродуктов в подземных водах // *Водоснабжение и санитарная техника*. 2021. N 11. С. 43–51. DOI: 10.35776/VST.2021.11.05. EDN: SDOTMG.
- Carmichael A.B., Wong L.-L. Protein engineering of *Bacillus megaterium* CYP102. The oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons // *European Journal of Biochemistry*. 2001. Vol. 268, no. 10. P. 3117–3125. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2001.02212.x.
- Johnson O.A., Affam A.C. Petroleum sludge treatment and disposal: a review // *Environmental Engineering Research*. 2019. Vol. 24, no. 2. P. 191–201. DOI: 10.4491/eer.2018.134.
- Ali M., Xu D., Yang X., Hu J. Microplastics and PAHs mixed contamination: an in-depth review on the sources, co-occurrence, and fate in marine ecosystems // *Water Research*. 2024. Vol. 257. P. 121622. DOI: 10.1016/j.watres.2024.121622.
- Aydin D.C., Faber S.C., Attiani V., Eskes J., Aldas-Vargas A., Grotenhuis T., et al. Indene, indane and naphthalene in a mixture with BTEX affect aerobic compound biodegradation kinetics and indigenous microbial community development // *Chemosphere*. 2023. Vol. 340. P. 139761. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2023.139761.
- Chang Y.-I., Cheng H.-P., Lai S.-H., Ning H. Biodegradation of naphthalene in the oil refinery wastewater by enriched activated sludge // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014. Vol. 86. Part C. P. 272–277. DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.09.018.
- Lin C., Gan L., Chen Z., Megharaj M., Naidu R. Biodegradation of naphthalene using a functional biomaterial based on immobilized *Bacillus fusiformis* (BFN) // *Biochemical Engineering Journal*. 2014. Vol. 90. P. 1–7. DOI: 10.1016/j.bej.2014.05.003.
- Rockne K.J., Strand S.E. Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene, and biphenyl by a denitrifying enrichment culture // *Water Research*. 2001. Vol. 35, no. 1. P. 291–299. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00246-3.
- Bagi A., Pampanin D.M., Lanzén A., Bilstad T., Kommedal R. Naphthalene biodegradation in temperate and arctic marine microcosms // *Biodegradation*. 2014. Vol. 25. P. 111–125. DOI: 10.1007/s10532-013-9644-3.
- Lin C., Gan L., Chen Z.-L. Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN) // *Journal of Hazardous Materials*. 2010. Vol. 182, no. 1-3. P. 771–777. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.06.101.
- Shen X., Dong W., Wan Y., Feng K., Liu Y., Wei Y. Influencing mechanisms of siderite and magnetite, on naphthalene biodegradation: Insights from degradability and mineral surface structure // *Journal of Environmental Management*. 2021. Vol. 299. P. 113648. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113648.
- Saeed M., Ilyas N., Bibi F., Jayachandran K., Datamudi S., Elgorban A.M. Biodegradation of PAHs by *Bacillus*

marsiflavi, genome analysis and its plant growth promoting potential // *Environmental Pollution*. 2022. Vol. 292. Part B. P. 118343. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.118343.

16. Sharma P., Gaur P., Dwivedi S., Kumari K., Srivastava J.K., Dhakar K., et al. Harnessing microbial potentials by advancing bioremediation of PAHs through molecular insights and genetics // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2024. Vol. 194. P. 105861. DOI: 10.1016/j.ibiod.2024.105861.

17. Кошелева И.А., Кочетков В.В., Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Соколов С.Л., Анохина Т.О. [и др.]. Плазмиды бактерий рода *Pseudomonas* // *История науки и техники*. 2020. N 6. С. 59–78. DOI: 10.25791/intstg.06.2020.1192. EDN: QZBECK.

18. Tarafdar A., Sinha A. Mastro R.E. Biodegradation of

anthracene by a newly isolated bacterial strain, *Bacillus thuringiensis* AT.ISM.1, isolated from a fly ash deposition site // *Letters in Applied Microbiology*. 2017. Vol. 65, no. 4. P. 327–334. DOI: 10.1111/lam.12785.

19. Даниленко А.О., Георгиади А.Г. Влияние современного потепления на водный и ионный сток Северной Двины // *Теоретическая и прикладная экология*. 2022. N 1. С. 64–69. DOI: 10.25750/1995-4301-2022-1-064-069. EDN: AUBAXL.

20. Лаптев Г.Ю., Йылдырым Е.А., Дуняшев Т.П., Ильина Л.А., Тюрина Д.Г., Филиппова В.А. [и др.]. Геномный и фенотипический потенциал антимикробной активности штамма бактерии *Bacillus megaterium* В-4801 // *Сельскохозяйственная биология*. 2020. Т. 55. N 4. С. 816–829. DOI: 10.15389/agrobiology.2020.4.816rus. EDN: ZHGJOC.

REFERENCES

1. Basumatary T., Parthipan P., Sarma H. Microbial contributions in restoring degraded biosphere habitats: comparing natural and engineered approaches. In: Sarma H., Joshi S.J. (eds). *Biotechnology of Emerging Microbes. Prospects for Agriculture and Environment*. Elsevier; 2024, p. 107-125. DOI: 10.1016/B978-0-443-15397-6.00008-5.

2. Edo G.I., Itoje-akpokiniyo L.O., Obasohan P., Ikpekor V.O., Samuel P.O., Jikahet A.N., et al. Impact of environmental pollution from human activities on water, air quality and climate change. *Ecological Frontiers*. 2024;44(5):874-889. DOI: 10.1016/j.ecofro.2024.02.014.

3. Yi Y., Xie B., Zhao T., Li Z., Stom D., Liu H. Effect of external resistance on the sensitivity of microbial fuel cell biosensor for detection of different types of pollutants. *Bioelectrochemistry*. 2019;125:71-78. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2018.09.003.

4. Kuzmin V.V., Boldyrev K. Hydrochemical modeling of migration of dissolved oil products in groundwater. *Water Supply and Sanitary Technique*. 2021;11:43-51. (In Russian). DOI: 10.35776/VST.2021.11.05. EDN: SDOTMG.

5. Carmichael A.B., Wong L.-L. Protein engineering of *Bacillus megaterium* CYP102. The oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *European Journal of Biochemistry*. 2001;268(10):3117-3125. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2001.02212.x.

6. Johnson O.A., Affam A.C. Petroleum sludge treatment and disposal: a review. *Environmental Engineering Research*. 2019;24(2):191-201. DOI: 10.4491/eer.2018.134.

7. Ali M., Xu D., Yang X., Hu J. Microplastics and PAHs mixed contamination: an in-depth review on the sources, co-occurrence, and fate in marine ecosystems. *Water Research*. 2024;257:121622. DOI: 10.1016/j.watres.2024.121622.

8. Aydin D.C., Faber S.C., Attiani V., Eskes J., Aldas-Vargas A., Grotenhuis T., et al. Indene, indane and naphthalene in a mixture with BTEX affect aerobic compound biodegradation kinetics and indigenous microbial community development. *Chemosphere*. 2023;340:139761. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2023.139761.

9. Chang Y.-I., Cheng H.-P., Lai S.-H., Ning H. Biodegradation of naphthalene in the oil refinery wastewater by enriched activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014;86:272-277. DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.09.018.

10. Lin C., Gan L., Chen Z., Megharaj M., Naidu R. Biodegradation of naphthalene using a functional bioma-

terial based on immobilized *Bacillus fusiformis* (BFN). *Biochemical Engineering Journal*. 2014;90:1-7. DOI: 10.1016/j.bej.2014.05.003.

11. Rockne K.J., Strand S.E. Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene, and biphenyl by a denitrifying enrichment culture. *Water Research*. 2001;35(1):291-299. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00246-3.

12. Bagi A., Pampanin D.M., Lanzén A., Bilstad T., Kommedal R. Naphthalene biodegradation in temperate and arctic marine microcosms. *Biodegradation*. 2014;25:111-125. DOI: 10.1007/s10532-013-9644-3.

13. Lin C., Gan L., Chen Z.-L. Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN). *Journal of Hazardous Materials*. 2010;182(1-3):771-777. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.06.101.

14. Shen X., Dong W., Wan Y., Feng K., Liu Y., Wei Y. Influencing mechanisms of siderite and magnetite, on naphthalene biodegradation: Insights from degradability and mineral surface structure. *Journal of Environmental Management*. 2021;299:113648. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113648.

15. Saeed M., Ilyas N., Bibi F., Jayachandran K., Datamudi S., Elgorban A.M. Biodegradation of PAHs by *Bacillus marsiflavi*, genome analysis and its plant growth promoting potential. *Environmental Pollution*. 2022;292:118343. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.118343.

16. Sharma P., Gaur P., Dwivedi S., Kumari K., Srivastava J.K., Dhakar K., et al. Harnessing microbial potentials by advancing bioremediation of PAHs through molecular insights and genetics. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2024;194:105861. DOI: 10.1016/j.ibiod.2024.105861.

17. Kosheleva I.A., Kochetkov V.V., Filonov A.E., Puntus I.F., Sokolov S.L., Anokhina T.O., et al. Plasmids of bacteria of the genus *Pseudomonas*. *History of Science and Engineering*. 2020;6:59-78. (In Russian). DOI: 10.25791/intstg.06.2020.1192. EDN: QZBECK.

18. Tarafdar A., Sinha A. Mastro R.E. Biodegradation of anthracene by a newly isolated bacterial strain, *Bacillus thuringiensis* AT.ISM.1, isolated from a fly ash deposition site. *Letters in Applied Microbiology*. 2017;65(4):327-334. DOI: 10.1111/lam.12785.

19. Danilenko A.O., Georgiadi A.G. The influence of modern climate warming on the water flow and major ion flux of the Northern Dvina. *Theoretical and Applied Ecology*. 2022;1:64-69. (In Russian). DOI: 10.25750/1995-4301-2022-1-064-069. EDN: AUBAXL.

20. Laptev G.Yu., Yildirim E.A., Dunyashev T.P., Ilyina L.A., Tyurina D.G., Filippova V.A., et al. Genomic and phenotypic potential of antimicrobial activity of a bacillus

strain *Bacillus megaterium* B-4801. *Agricultural Biology*. 2020;55(4):816-829. (In Russian). DOI: 10.15389/agrobiology.2020.4.816rus. EDN: ZHGJOC.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Коваленко Светлана Анатольевна,
аспирант,
Байкальский музей СО РАН,
664520, п. Листвянка, ул. Академическая, 1,
Российская Федерация,
kovsvan@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0005-4259-397X>

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

Стом Дэвард Иосифович,
д.б.н., профессор,
главный научный сотрудник,
Байкальский музей СО РАН,
664520, п. Листвянка, ул. Академическая, 1,
Российская Федерация,
ведущий научный сотрудник,
Сургутский государственный университет,
628412, г. Сургут, пр. Ленина, 1,
Российская Федерация,
профессор,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
профессор,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ stomd@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9496-2961>

Вклад авторов

С.А. Коваленко – постановка задачи, разработка концепции и методологии исследования, проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов, написание текста статьи, редактирование текста статьи.
А.Б. Купчинский – постановка задачи, обсуждение результатов, редактирование текста статьи.
Д.И. Стом – постановка задачи, обсуждение результатов, редактирование текста статьи.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Svetlana A. Kovalenko,
Postgraduate Student,
Baikal Museum SB RAS,
1, Academic St., Listvyanka, 664520,
Russian Federation,
kovsvan@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0005-4259-397X>

Alexander B. Kupchinsky,
Cand. Sci. (Biology), Director,
Baikal Museum SB RAS,
1, Academic St., Listvyanka, 664520,
Russian Federation,
albor67@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8884-8636>

Devard I. Stom,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Chief Researcher,
Baikal Museum SB RAS,
1, Akademicheskaya St., Listvyanka, 664520,
Russian Federation;
Leading Researcher,
Surgut State University,
1, Lenin Ave., Surgut, 628412,
Russian Federation;
Professor,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ stomd@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9496-2961>

Contribution of the authors

Svetlana A. Kovalenko – problem formulation, research concept and methodology development, conducting experiments, data processing, results discussion, writing and editing the text of manuscript.
Alexander B. Kupchinsky – problem formulation, results discussion, editing the text of manuscript.
Devard I. Stom – problem formulation, 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 27.08.2024.
Одобрена после рецензирования 28.11.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

Information about the article

The article was submitted 27.08.2024.
Approved after reviewing 28.11.2024.
Accepted for publication 30.11.2024.



Synthesis of three-dimensional matrices based on collagen–pectin–polyacrylate grafted copolymers using the $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ photocatalyst

Ludmila L. Semenycheva✉, Veronika V. Prodaevich, Victoria O. Rumyantseva,
Diana G. Fukina, Andrey V. Koryagin, Natalia B. Valetova,
Olga N. Smirnova, Evgeny V. Suleimanov

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

Abstract. The development of new promising materials of three-dimensional structure from available bioresorbable, biointegrable and biocompatible polymers is in demand and relevant in connection with the intensive development of regenerative medicine. In this work, hydrogels of the grafted copolymers of methyl methacrylate/butyl acrylate onto a mixture of collagen and pectin were obtained during photocatalysis in the presence of a complex oxide $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$. The characteristics of the synthesis products were obtained by gel penetrating chromatography, elemental analysis, electron microscopy, and biological biocidal tests. The collagen content in an amount of less than 40%, the microstructure of the polymer in the form of a fine-mesh, and the biocidity of the sample films were established. The polymer product was identified on the catalyst surface after the separation of the oxide powder from the aqueous dispersion. The main advantage of such materials is the unique combination of properties of their components assembled into a specific structure. The advantages of the obtained material include, among other things, the environmental advantage of the initial components - natural renewable raw materials: collagen was isolated from cod processing waste, pectin from fruit and vegetable processing waste.

Keywords: fish collagen, pectin, complex oxide $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$, photocatalysis, grafted copolymers, three-dimensional matrix

Funding. This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (assignment FSWR-2023-0024) on the equipment of the Collective Usage Center “New Materials and Resource-saving Technologies” (Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod).

For citation: Semenycheva L.L., Prodaevich V.V., Rumyantseva V.O., Fukina D.G., Koryagin A.V., Valetova N.B., et al. Synthesis of three-dimensional matrices based on collagen–pectin–polyacrylate grafted copolymers using the $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ photocatalyst. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):556-566. DOI: 10.21285/achb.951. EDN: YOETUS.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 547.96:547.458.88:544.526.5

EDN: YOETUS

DOI: 10.21285/achb.951

Синтез трехмерных матриц на основе привитых сополимеров коллаген–пектин–полиакрилат с использованием фотокатализа в присутствии сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$

Л.Л. Семеничева✉, В.В. Продаевич, В.О. Румянцева, Д.Г. Фукина,
А.В. Корягин, Н.Б. Валетова, О.Н. Смирнова, Е.В. Сулейманов

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

Аннотация. Разработка новых перспективных материалов трехмерной структуры из доступных биорезорбируемых, биоинтегрируемых и биосовместимых полимеров востребована и актуальна в связи с интенсивным развитием

© Semenycheva L.L., Prodaevich V.V., Rumyantseva V.O., Fukina D.G., Koryagin A.V., Valetova N.B., Smirnova O.N., Suleimanov E.V., 2024

регенеративной медицины. В данной работе гидрогели привитых полимеров метилметакрилата/бутилакрилата на смесь коллагена и пектина были получены в ходе фотокатализа в присутствии сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$. Характеристики продуктов синтеза были получены с помощью гель-проникающей хроматографии, элементного анализа, электронной микроскопии и биологических тестов на биоцидность. Было установлено содержание коллагена в количестве менее 40%, микроструктура полимера в виде мелкочаечистой сетки и биоцидность образцов пленок. Полимерный продукт был идентифицирован на поверхности катализатора после отделения порошка оксида от водной дисперсии. Основным преимуществом таких материалов является уникальное сочетание свойств их компонентов, собранных в определенную структуру. К преимуществам полученного материала относится в том числе экологическая ценность исходных компонентов – натурального возобновляемого сырья: коллаген был выделен из отходов переработки трески, пектин – из отходов переработки фруктов и овощей.

Ключевые слова: рыбный коллаген, пектин, комплексный оксид $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$, фотокатализ, привитой сополимер, трехмерная матрица

Финансирование. Данная работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (задание FSWR-2023-0024) на оборудовании Центра коллективного пользования «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии» (Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского).

Для цитирования: Семенычева Л.Л., Продаевич В.В., Румянцева В.О., Фукина Д.Г., Корягин А.В., Валетова Н.Б. [и др.]. Синтез трехмерных матриц на основе привитых сополимеров коллаген–пектин–полиакрилат с использованием фотокатализа в присутствии сложного оксида $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 556–566. DOI: 10.21285/achb.951. EDN: YOETUS.

INTRODUCTION

The three-dimensional supramolecular structure is characteristic of biological origin macromolecules, such as proteins, nucleic acids or carbohydrates. It is known that the shape and conformation of macromolecules and the interaction between their components play an important role in their functioning and interaction with each other and determine the active sites where processes occur that allow macromolecules to bind to other molecules, such as enzymes, receptors or drugs [1]. Artificial modeling of three-dimensional structures from available bioresorbable, biointegrable and biocompatible polymers has become one of the most developing areas of scientific research in polymer chemistry. It is due to the practical aspects of using such structures in regenerative medicine, targeted drug delivery, etc. Nowadays, there are several approaches to creating three-dimensional structures based on fibrillar macromolecules of synthetic and natural origin: strategies of double mesh, double crosslinked or interpenetrating nets, chemical modification due to covalent and non-covalent interactions along the bonds involved in these mechanisms [2–4].

Chemical crosslinking is an important step to give satisfactory properties to collagen-based materials. There are several comparative studies on the crosslinking of collagen-based fibrillar gels, which are preferred biomaterials due to properties similar to native tissues with various crosslinking agents [5, 6]. The main advantage of such materials is the unique combination of properties of their components assembled into a specific structure. The advantages of the new material include the environmental advantage of the initial components – natural renewable raw materials: collagen was isolated from cod processing waste, pectin from fruit and vegetable processing waste. The literature provides examples in which pectin can act as a compatible component of collagen in the production of three-dimensional matrices, but the process requires optimization for specific compositions [7, 8]. Various examples can be given: the fibrillar gel was prepared from tilapia collagen and alginate in [9], using tilapia collagen and hyaluronic acid in [10], the invention [11] reveals a method for obtaining

and using a recombinant type III collagen gel and sodium hyaluronate with double crosslinking. These examples indicate the prospects of research on the production of three-dimensional structures based on natural polymers of different natures: proteins and polysaccharides. It should be noted that such an approach to obtaining new materials for medicine is dictated by the nature of living organisms: the main substances of the intercellular matrix of any living organism performing structure-forming, protective, and other functions are proteoglycans and glycoproteins, which are structured copolymers of proteins and glycans (polysaccharides) [12–15].

Earlier in our research, we obtained grafted copolymers of some vinyl monomers for cod collagen (CC) [16–20] and pectin [21] synthesized using photocatalysis in the presence of complex oxide $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ and known modifying additives (triethylene glycol dimethacrylate (TEDMA), polyethylene glycol (PEG), acrylic acid (AA)). It was found in [21] that the addition of TEDMA in small quantities and AA in an amount commensurate with the concentration of methyl methacrylate (MMA) to the reaction mixture upon obtaining grafted copolymers of acrylates onto cod collagen, after neutralization of the reaction mixture with 1M NaOH solution at the end of synthesis, it is possible to obtain a mixture of grafted and cross-linked polymer, which is stable in aqueous solution and does not form a coagulate. The addition of PEG to the initial mixture in an amount commensurate with the amount of collagen, after neutralization of the reaction mixture, makes it possible to obtain coagulate of a cross-linked structure. Such a hydrogel easily releases water when dried in vacuum and forms a polymer composite film.

The change in the structure of macromolecules when polysaccharide is added into the initial reaction mixture along with collagen is associated with known interactions such as van der Waals, electrostatic, hydrophobic, and hydrogen bonds. In the presence of active radicals pectin interacts during synthesis, as in the case of collagen, with a hydroxyl radical due to the separation of the hydrogen atom of the hydrocarbon part of the polysaccharide molecule is possible, presumably according to scheme 1. In addition,

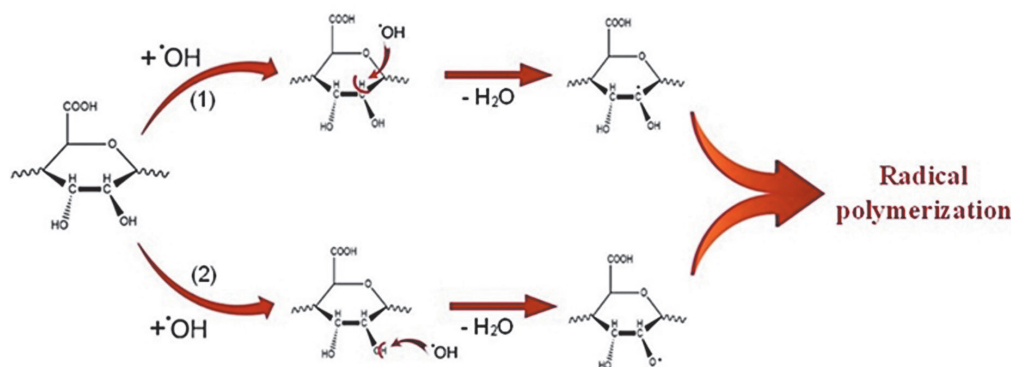


Fig. 1. Scheme of a hydroxyl radical interaction with polysaccharides

Рис. 1. Схема взаимодействия гидроксильного радикала с полисахаридами

this may occur due to the separation of the hydrogen atom from the hydroxyl group of the polysaccharide, presumably according to scheme 2 (Fig. 1), forming radicals in the macromolecule of the polysaccharide [22–24].

These newly formed radicals are active in all radical transformations in the reaction mixture: they interact with the monomer and form a grafted synthetic fragment or participate in a chain transfer reaction, or disproportionate with another active radical and also recombine, i.e. they form additional covalent bonds in the material¹.

In this work, the purpose is to obtain new hydrogels based on grafted copolymers of MMA and butyl acrylate (BA) on fish (cod) collagen synthesized using the $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ photocatalyst, with simultaneous addition of polysaccharide – pectin to the composition of the initial reaction mixture (Pect-CC-PMMA and Pect-CC-PBA). Pectin is not only a modifying agent, but also an additional polymer substrate, along with collagen, on which centers of initiation of radical polymerization of acrylate monomers are formed. The obtained new materials should be characterized for a number of important indicators. In this regard, the main task of the study was to introduce into the initial reaction mixture (fish collagen – vinyl monomer (MMA, BA)) as a modifier and a second natural component of pectin in amounts commensurate with collagen, and to control its effect on the composition and properties of the resulting composite in comparison with the MMA/BA copolymer on collagen. It should be especially noted that collagen and pectin are constantly renewable raw materials. Both polymers are isolated from production waste: fish collagen from fish industry waste, pectin from fruit and vegetable processing waste. Currently, it is important if we consider the prospect of using the development in medicine.

EXPERIMENTAL

Materials. Commercial reagents were used without pretreatment: apple pectin (“S.Pudov”), acetic acid, sodium hydroxide, acrylic acid, TEDMA, PEG. MMA and BA were pre-purified from the stabilizer by washing with a solution of sodium hydroxide, then rinsed with cold water to a neutral pH, dried using calcium chloride and distilled in vacuum. The photocatalyst $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ was obtained by the method [25].

Isolation of cod collagen. Collagen was isolated by the method [26] by extraction with acetic acid for one day at room temperature. The resulting acetic acid dispersion was dried to a constant weight under vacuum (1.33 Pa) at 50 °C.

Synthesis of graft copolymers under photocatalysis conditions. Pectin and collagen were dissolved separately in a small amount of water at a temperature from 50 to 70 °C with stirring, an emulsion was prepared by mixing the components in the ratio pectin:collagen:monomer:water = 2,5:2,5:5,0:90, a catalyst was added, argon was bubbled for 15 minutes, then stirred (800 rpm) under irradiation with a visible light LED lamp (LED, 30 W, $\lambda = 400\text{--}600\text{ nm}$) in argon current for 5 hours. After polymerization, the reaction mixture was centrifuged at 4000 rpm to separate the catalyst. The catalyst was washed in water 3 times at 50 °C for 20 minutes and dried to a constant weight.

Analysis of molecular weight characteristics by gel-permeating chromatography. Molecular mass characteristics were determined by gel-permeating chromatography (GPC). Aqueous solutions of copolymers isolated from the reaction mixture were analyzed using a high-performance liquid chromatograph manufactured by Shimadzu CTO 20A/20A C (Japan) using LC solutions. Separation was performed using a Tosoh Bioscience TSKgel g3000swxl column with a pore diameter of 5 microns and a low-temperature light scattering detector ELSD-LT II. The eluent was 0.5 M acetic acid solution, the flow rate was 0.8 ml/min, and narrowly dispersed dextran standards with a molecular weight range (MW) of 1–410 kDa (Fluca) were used for calibration.

Scanning electron microscopy. The surface of lyophilically dried copolymer samples was studied using a scanning electron microscope JSM-IT 300 (Jeol Ltd., Japan) with an electron probe diameter of 5 nm (operating voltage 20 kV), using detectors of low-energy secondary electrons and backscattering electrons in low vacuum mode to avoid the samples charging.

Elemental analysis of copolymers. The analysis of dried samples was carried out by the CHNS analysis method on the vario EL cube element analyzer for simultaneous determination of CHNS(O). Elemental analysis of the catalyst surface was performed using X-ray microprobe analysis (RMA) with a detector X-MaxN 20 (Oxford Instruments) $\text{K}\alpha(\text{O})$ and $\text{L}\alpha(\text{Rb, Te, W})$.

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

Freeze drying. The sponges of the samples were obtained by lyophilic drying. The solvent was distilled under vacuum (1.33 Pa) using deep freezing by liquid nitrogen.

Studies of polymer films for resistance to microscopic fungi. The study of mushroom resistance was carried out according to GOST 9.049-91 "Polymer materials and their components" method 1. The film samples were placed in Petri dishes. Then the samples surface was inoculated with a suspension of spores of micromycetes test cultures, active destructors of polymer materials: *Aspergillus oryzae* F-2096, *Aspergillus niger* F-1119, *Aspergillus terreus* F-1025, *Chaetomium globosum* F-109, *Paecilomyces variotii* F-378, *Penicillium funiculosum* F-1115, *Penicillium chrysogenum* F-245, *Penicillium cyclopium* F-245, *Trichoderma viride* A-1117. Petri dishes with samples were placed in a thermostat for 28 days at a temperature of 29 ± 2 °C and humidity of more than 90%. After the test time, the fungal resistance of the samples was evaluated on a 6-point scale (Table). The area of biofouling and the degree of micromycetes development on the samples were taken into account when assessing fungal resistance. Samples of materials on which the growth of fungi did not exceed 2 points were considered to be fungal resistant.

Assessment of the samples fungal resistance

Оценка устойчивости образцов к грибкам

Score	Characteristic of the score
0	No germination of spores and conidia was detected under the microscope
1	Sprouted spores and a slightly developed mycelium are visible under the microscope
2	A developed mycelium is visible under the microscope, sporulation is possible
3	The mycelium and/or sporulation are barely visible to the naked eye, but are clearly visible under a microscope
4	The development of fungi covering less than 25% of the test surface is clearly visible to the naked eye
5	The development of fungi covering more than 25% of the test surface is clearly visible to the naked eye

RESULTS AND DISCUSSION

The effect of pectin on the structure and properties of grafted copolymers "pectin – CC – polyacrylate" was controlled by physicochemical characteristics. Once again, it should be noted that collagen isolated from any natural substrates, even with the most delicate isolation in the form of a high-molecular polymer with MM ~300 kDa, does not have sufficient mechanical strength. It is due to the fact that the intra- and intermolecular cross-links that arise during the biosynthesis of collagen in vivo and give its fibrils a stable structure, mechanical strength and resistance to the action of enzymes are destroyed during its release into solution. In this regard, an important step in the creation of any collagen materials is the development of crosslinking conditions that ensure mechanical strength and stability during the whole life of the material. At the same time, crosslinking agents are used for collagen fibers of various natures [3, 4].

The process of grafted copolymers synthesis was carried out in dispersion, using aqueous solutions with the inclusion of MMA (Pect-CC-PMMA) and BA (Pect-CC-PBA). After the

end of the syntheses and the stopping of mixing, the gel coagulated from the reaction mixture (Fig. 2).

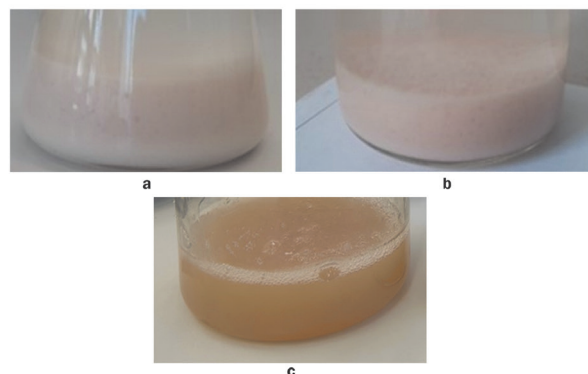


Fig. 2. Images of reaction mixtures Pect-CC-PMMA (a) and Pect-CC-PBA (b) after synthesis, Pect-CC-MMA before synthesis (c)

Рис. 2. Фотографии реакционных смесей Пект-ТК-ПММА (а) и Пект-ТК-ПБА (б) после синтеза, Пект-ТК-ММА до синтеза (с)

Analysis of the nitrogen content in the isolated and dried polymer products showed that they contain collagen and its amount is significantly less than for the sample of the copolymer PMMA-collagen-PEG-AA (CCC-1) (Fig. 3) [20]. It indicates that pectin is more part of the formed copolymers than PEG.

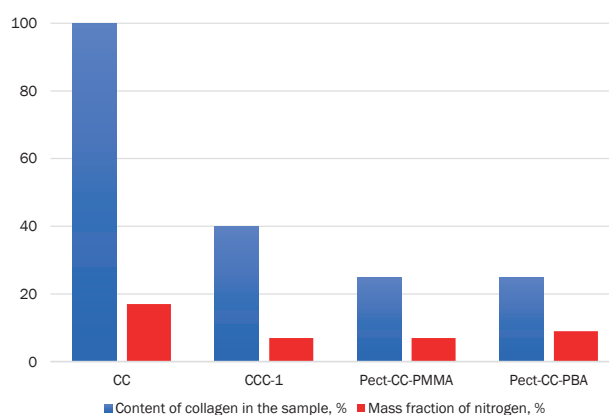


Fig. 3. Nitrogen and collagen content in the samples according to elemental analysis data

Рис. 3. Содержание азота и коллагена в образцах по данным элементного анализа

The SEM images of the new grafted copolymers Pect-CC-PMMA and Pect-CC-PBA (Fig. 4, a–d) indicate the cellular structure of the copolymers. Comparing them with the morphology image of previously obtained samples from PEG – sample CCC-1 (Fig. 4, e) [20] shows that the morphology of the new materials differs markedly, including the size, shape and dimensional organization of the cellular structure. It can be seen that the pore size in the case of grafted copolymers with pectin for both MMA and BA is significantly smaller than for copolymers obtained under comparable conditions with PEG (samples with the same magnification: a, b – with pectin, e – with PEG). At the same time, collagen fibers are significantly

more compacted in the case of PEG copolymers (see Fig. 4, e) than for grafted copolymers with pectin (see Fig. 4, a, b). That is, the introduction of pectin into the composition of copolymers with both MMA and BA leads to the formation of a small-cell matrix with less pronounced outlines of structural fibrils. In addition, it can be noted that with a greater magnification in grafted copolymers with pectin (see Fig. 4, c, d), the interpenetration of external and internal pores is clearly visible, which is important in scaffold technologies to characterize the degree of channel interconnection of matrix pores [27, 28].

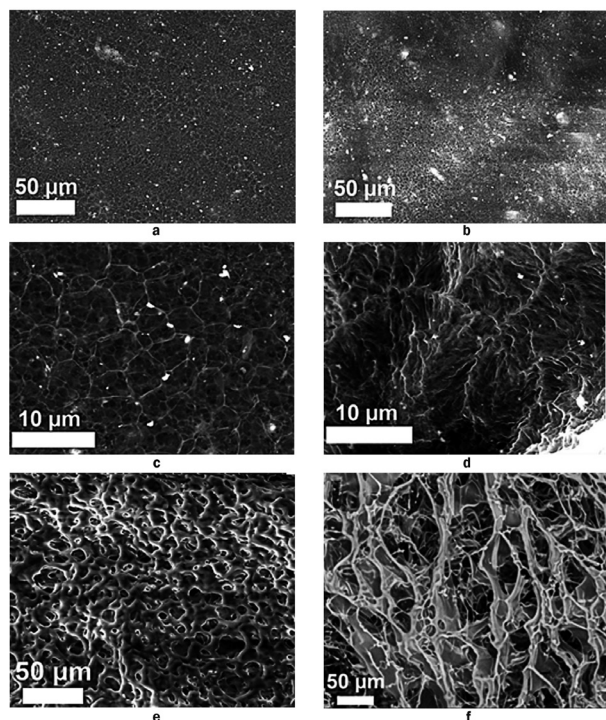


Fig. 4. Scanning electron microscope images of copolymers Pect-CC-PMMA (a, c), Pect-CC-PBA (b, d), CCC-1 (e) [20] and collagen (f) [16]

Рис. 4. Выполненные при помощи сканирующего электронного микроскопа изображения сополимеров Пект-ТК-ПММА (а, с), Пект-ТК-ПБА (b, d), CCC-1 (е) [20] и коллагена (f) [16]

In the aqueous phase, after coagulation of the Pect-CC-PMMA and Pect-CC-PBA copolymers, polymer fractions with MW ~190 kDa, ~11 kDa and ~22 kDa and oligomeric fragments with MW less than 0.5 kDa were found not embedded in the grafted copolymer matrix. Most likely, the high-molecular polymer is collagen, fragments with MW ~11 and ~22 kDa can be attributed to both collagen and pectin, since it is precisely such low-molecular collagen that is formed because of collagen hydrolysis and is determined in pectin [29, 30]. Oligomeric fractions are characteristic of pectin [30]. In general, an important conclusion from the analysis by the GPC method is the statement of the presence of the initial polymers residues that are not embedded in the structure of the Pect-CC-PMMA and Pect-CC-PBA

copolymers. This may be primarily due to the insufficient amount of hydroxyl radicals necessary for the formation of grafted and crosslinked polymers. This is due to the adsorption of synthetic monomers and the grafting of synthetic polymer products on the catalyst' surface. Apparently, in this case, the process of interaction of electron-hole pairs with water becomes hysterically difficult, and the formation of a hydroxyl radical practically stops. In addition, increasing the electron migration path along the chain of polymer molecules from the catalyst to the radical center in solution increases the probability of recombination of the electron-hole pair. This leads to a sharp decrease in the number of active particles and formed radicals, and, consequently, to a slowdown and stop of the polymerization reaction in solution [18].

It is important to note that polymer materials based on natural polymers are easily damaged by biological agents under operating conditions, the main among which are microscopic fungi² [31]. It was previously noted that the PMMA-CC copolymer has fungal resistance due to the content of $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ oxide particles in micro quantities with sizes ≤ 2 nm [32]. In Fig. 4, a–d, such particles are clearly visible. It was necessary to find out whether the new materials Pect-CC-PMMA and Pect-CC-PBA have fungal-resistant properties. During the experiments, it was shown that the growth of fungi on Pect-CC-PMMA and Pect-CC-PBA polymer materials films was 0 scores. It suggests that these materials are not capable of being used by fungi as a food source. It is important because the biostability of polymer composites is a critical property of such materials, since it determines the long-term operation function of a particular product in conditions of possible fungal damage.

It should be mentioned that, as in previously published research [16, 21], fragments of polymer macromolecules were found on the catalyst surface (Fig. 5), which are isolated on the surface by homogeneous filaments with a large diameter or plates. Such organic fragments are formed on the surface due to the grafting of acrylate onto the radicals of the catalyst surface, the occurrence of which is associated with the interaction of hydroxyl radicals with hydroxyl groups always present on the surface of metal oxides. It has already been discussed earlier in the works [16, 21].

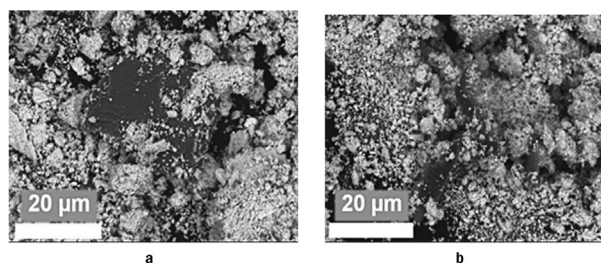


Fig. 5. Scanning electron microscope images of the catalyst surface

Рис. 5. Выполненные при помощи сканирующего электронного микроскопа изображения поверхности катализатора

² Ерофеев В.Т., Смирнов В.Ф., Морозов Е.А. Микробиологическое разрушение материалов: учеб. пособие для студентов. М.: Изд-во Ассоциации строительных вузов, 2008. 123 с.

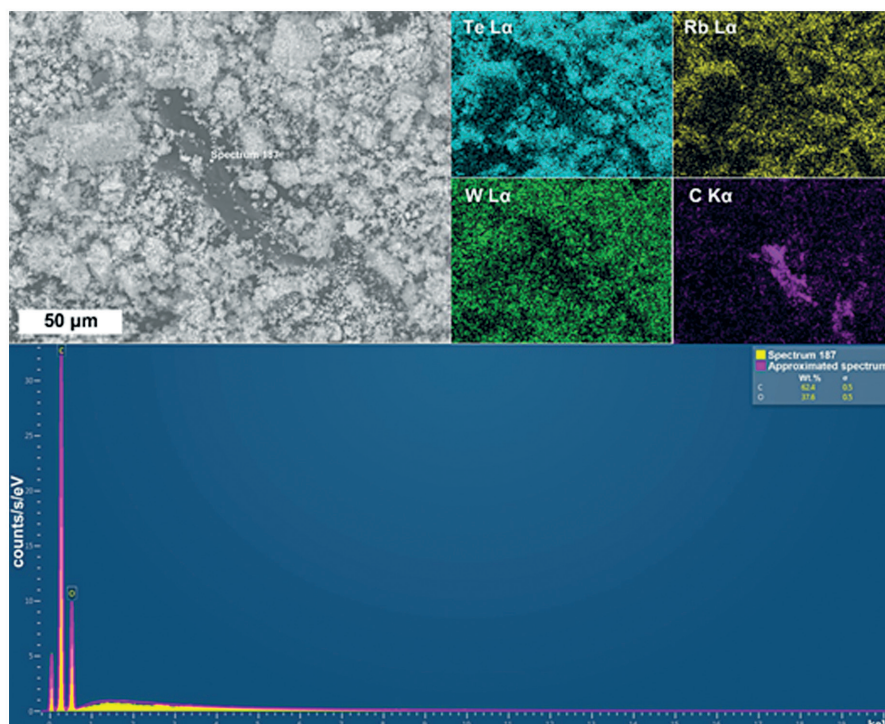


Fig. 6. Scanning electron microscope images of the catalyst surface after synthesis and maps of the elements distribution

Рис. 6. Выполненные при помощи сканирующего электронного микроскопа изображения поверхности катализатора после синтеза и карты распределения элементов

The evidence of the organic nature of such filaments is provided by studies of the elemental composition of the samples, which were carried out using the X-ray microanalysis (Fig. 6). To determine how atoms are distributed in the sample, maps of the elements distribution were obtained (see Fig. 6). In this case, it can be seen that the distribution of the elements Rb, Te, W on the studied surface is homogeneous and corresponds to powder particles of photocatalyst. Fragments of organic filaments are clearly visible on all maps, and the chemical composition of the sample in the selected area (C and O content), shown in the spectrum and in the table in Fig. 6, indicates the organic nature of the selected area.

CONCLUSIONS

As a result of the conducted studies, hydrogels of the grafted copolymers Pect-CC-PMMA and Pect-CC-PBA were obtained using photocatalysis in the presence of a complex oxide $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$. Polymer products are characterized by

methods of elemental analysis and electron microscopy. Dry polymer products, as it turned out, contain collagen in an amount of less than 40%. The SEM images demonstrate the formation of a small-cell matrix for these polymer composites. By the GPC method, it was found that some of the natural polymers of collagen and pectin remained in aqueous dispersion and did not enter the structure of the new material. It was revealed using an X-ray microprobe analyzer that a part of polyacrylates is identified on the catalyst surface after its separation from the aqueous dispersion. The new materials are fungus-resistant, which is important for the long-term operation function of a particular product in conditions of possible fungal damage. The results of the study indicate the expediency of developing research on modified materials based on grafted copolymers of methyl methacrylate, pectin and fish collagen prepared by the $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ photocatalysis to obtain a wide range of medical products: colloidal solutions, gels, films.

REFERENCES

1. Ryskina E.A., Gylmiyarova F.N., Koloteva N.A., Potekhina V.I., Gorbacheva I.V. Biomolecules and interaction between them. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2017;6-1:97-101. (In Russian). EDN: YOSLBB.
2. Mortier C., Costa D.C.S., Oliveira M.B., Haugen H.J., Lyngstadaas S.P., Blaker J.J., et al. Advanced hydrogels based on natural macromolecules: chemical routes to achieve mechanical versatility. *Materials Today Chemistry*. 2022;26:101222. DOI: 10.1016/j.mtchem.2022.101222.
3. Viateau V., Zhou J., Guérard S., Manassero M., Thourot M., Anagnostou F., et al. Ligart: Synthetic "bioactive" and "biointegrable" ligament allowing a rapid recovery of patients: chemical grafting, in vitro and in vivo biological evaluation, animal experiments, preclinical study. *Innovation and Research in BioMedical engineering*. 2011;32(2):118-122. DOI: 10.1016/j.irbm.2011.01.007.
4. Vikingsson L., Antolinos-Tupin C.M., Gómez-Tejedor J.A., Gallego Ferrer G., Gómez Ribelles J.L. Prediction of the "in vivo" mechanical behavior of biointegrable acrylic macroporous scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;61:651-658. DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.068.

5. Adamiak K., Sionkowska A. Current methods of collagen cross-linking: review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;161:550-560. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075.
6. Nashchekina Y.A., Lukonina O.A., Darvish D.M., Mikhailova N.A., Nashchekin A.V., Elokhevskii V.Y., et al. Biological and rheological properties of collagen cross-linked with glutaraldehyde. *Zhurnal tekhnicheskoi fiziki*. 2020;90(9):1601-1606. (In Russian). DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49697.33-20. EDN: SLVQCW.
7. Shchablykina A.V., Mishchenko P.V., Kumeiko V.V. Pectin-based biocompatible degradable materials for tissue engineering: local tissue reaction after subcutaneous implantation. *Pacific Medical Journal*. 2013;2:13-17. (In Russian). EDN: QZWEFH.
8. Jayakumara G.C., Usharani N., Kawakami J., Rao J.R., Nair B.U. Studies on the physico-chemical characteristics of collagen – pectin composites. *RSC Advances*. 2014;4(109):63840-63849. DOI: 10.1039/c4ra10368h.
9. Yue S., Ruhua M., Rui N., Cungan G. *Recombinant collagen capable of self-assembling into gel and preparation method and application thereof*. Patent CN, no. 115724924A; 2023. (In Chinese).
10. Yan M., An X., Duan S., Jiang Z., Liu X., Zhao X., et al. A comparative study on cross-linking of fibrillar gel prepared by tilapia collagen and hyaluronic acid with EDC/NHS and genipin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;213:639-650. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.006.
11. Liang C., Jianyong L., Xiaochao C. *Preparation method and application of recombinant type III collagen-sodium hyaluronate double-crosslinked gel*. Patent CN, no. 116603104A; 2023. (In Chinese).
12. Xie C., Schaefer L., Iozzo R.V. Global impact of proteoglycan science on human diseases. *iScience*. 2023;26(11):108095. DOI: 10.1016/j.isci.2023.108095.
13. Zhang M., Ou X., Shi H., Huang W., Song L., Zhu J., et al. Isolation, structures and biological activities of medicinal glycoproteins from natural resources: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;244:125406. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125406.
14. Zhang Ch., Zhou Z., Fu S., Yu C., Irfan M., Su X. DNA nanoprobes for detection and imaging of glycoproteins. *Nano Today*. 2023;51:101893. DOI: 10.1016/j.nantod.2023.101893.
15. Deng Y., Ma L., Han Q., Yu C., Johnson-Buck A., Su X. DNA-templated timer probes for multiplexed sensing. *Nano Letters*. 2020;20(4):2688-2694. DOI: 10.1021/acs.nanolett.0c00313.
16. Semenycheva L., Chasova V., Fukina D., Suleymanov E. Synthesis of polymethyl-methacrylate–collagen-graft copolymer using a complex oxide $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ photocatalyst. *Polymer Science, Series D*. 2022;15:110-117. DOI: 10.1134/S1995421222010166.
17. Chasova V., Semenycheva M., Egorkhina M., Charykova I., Linkova D., Rubtsova Y., et al. Cod gelatin as an alternative to cod collagen in hybrid materials for regenerative medicine. *Macromolecular Research*. 2022;30:212-221. DOI: 10.1007/s13233-022-0017-9.
18. Chasova V.O., Fukina D.G., Boryakov A.V., Koroleva E.V., Semenycheva L.L., Suleymanov E.V. The effect of methyl methacrylate transformations during photocatalysis in the presence of $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ on the change of the complex oxide surface. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(2):208-221. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-2-208-221. EDN: STAHHQ.
19. Semenycheva L., Chasova V., Fukina D., Koryagin A., Belousov A., Valetova N., et al. Photocatalytic synthesis of materials for regenerative medicine using complex oxides with β -pyrochlore structure. *Life*. 2023;13(2):352. DOI: 10.3390/life13020352.
20. Semenycheva L., Chasova V., Sukhareva A., Fukina D., Koryagin A., Valetova N., et al. New composite materials with cross-linked structures based on grafted copolymers of acrylates on cod collagen. *Applied Sciences*. 2023;13(9):5455. DOI: 10.3390/app13095455.
21. Semenycheva L., Chasova V., Matkivskaya J., Fukina D., Koryagin A., Belaya T., et al. Features of polymerization of methyl methacrylate using a photocatalyst – the complex oxide $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 2021;31:3572-3583. DOI: 10.1007/s10904-021-02054-6.
22. Walling C. *Free radicals in solution*. New York: Wiley; 1957, 631 p.
23. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press; 1999, 936 p.
24. Rozantsev E.G., Sholle V.D. *Organic chemistry of free radicals*. Moscow: Khimiya; 1979, 344 p. (In Russian).
25. Fukina D.G., Koryagin A.V., Koroleva A.V., Zhizhin E.V., Suleimanov E.V., Kirillova N.I. Photocatalytic properties of β -pyrochlore $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ under visible-light irradiation. *Journal of Solid State Chemistry*. 2021;300:122235. DOI: 10.1016/j.jssc.2021.122235.
26. Semenycheva L.L., Astanina M.V., Kuznetsova J.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. (In Russian).
27. Kopelev P.V., Nashchekina Y.A., Alexandrova S.A. Comparative analysis of 3d poly(l,l-lactic) scaffolds with various porosity for cartilage tissue regeneration. *Bulletin of innovative technologies*. 2018;2(3):25-31. (In Russian). EDN: XWXOSL.
28. Sadovoy M.A., Larionov P.M., Samokhin A.G., Rozhnova O.M. Cellular matrices (scaffolds) for bone regeneration: state of the art. *Russian Journal of Spine Surgery*. 2014;2:79-86. (In Russian). DOI: 10.14531/ss2014.2.79-86. EDN: YSREXR.
29. 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.
30. Semenycheva L.L., Kuleshova N.V., Mitin A.V., Belaya T.A., Mochkina D.V. Molecular weight characteristics and sorption properties of pectin extracted from different substrates. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):728-737. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-4-728-737. EDN: KMLLHY.
31. Eliazyan G.A., Margaryan S.M., Paronikyan A.E., Margaryan L.Y. Studying the biocidal treatment of the leather of medieval book covers by the method of retanning with an aluminum complex stabilized by trimethylolmelema. *NPUA Proceedings – Metallurgy, Material Science, Mining Engineering*. 2021;1:82-88. (In Russian). DOI: 10.53297/18293395-2021.1-82. EDN: HLLTY.

32. Suleimanov E.V., Chasova V.O., Valetova N.B., Semenycheva L.L., Fukina D.G., Koryagin A.V., et al. *Method*

for obtaining grafted methyl methacrylate copolymer on collagen. Patent RF, no. 2777896C1; 2022.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Рыскина Е.А., Гильмиярова Ф.Н., Колотьева Н.А., Потехина В.И., Горбачева И.В. Биомолекулы и взаимодействия между ними // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2017. N 6-1. С. 97–101. EDN: YOSLBB.

2. Mortier C., Costa D.C.S., Oliveira M.B., Haugen H.J., Lyngstadaas S.P., Blaker J.J., et al. Advanced hydrogels based on natural macromolecules: chemical routes to achieve mechanical versatility // *Materials Today Chemistry*. 2022. Vol. 26. P. 101222. DOI: 10.1016/j.mtchem.2022.101222.

3. Viateau V., Zhou J., Guérard S., Manassero M., Thourot M., Anagnostou F., et al. Ligart: ligament synthétique “bioactif” et “biointégréable” permettant la réhabilitation rapide du patient: greffage chimique, évaluations biologiques in vivo, expérimentation animale, étude préclinique // *Innovation and Research in BioMedical engineering*. 2011. Vol. 32, no. 2. P. 118–122. DOI: 10.1016/j.irbm.2011.01.007.

4. Vikingsson L., Antolinos-Tupin C.M., Gómez-Tejedor J.A., Gallego Ferrer G., Gómez Ribelles J.L. Prediction of the “in vivo” mechanical behavior of biointegrable acrylic macroporous scaffolds // *Materials Science and Engineering: C*. 2016. Vol. 61. P. 651–658. DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.068.

5. Adamiak K., Sionkowska A. Current methods of collagen cross-linking: review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 161. P. 550–560. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.075.

6. Нащекина Ю.А., Луконина О.А., Дарвиш Д.М., Нащекин А.В., Елоховский В.Ю., Юдин В.Е. [и др.]. Биологические и реологические свойства коллагена, сшитого глутаровым альдегидом // *Журнал технической физики*. 2020. Т. 90. N 9. С. 1601–1606. DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49697.33-20. EDN: SLVQCW.

7. Щерблыкина А.В., Мищенко П.В., Кумейко В.В. Биосовместимые деградируемые материалы на основе пектинов для тканевой инженерии: местная реакция тканей при подкожной имплантации // *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2013. N 2. С. 13–17. EDN: QZWEFH.

8. Jayakumara G.C., Usharani N., Kawakami J., Rao J.R., Nair B.U. Studies on the physico-chemical characteristics of collagen – pectin composites // *RSC Advances*. 2014. Vol. 4, no. 109. P. 63840–63849. DOI: 10.1039/c4ra10368h.

9. Pat. no. 115724924A, China. Recombinant collagen capable of self-assembling into gel and preparation method and application thereof / S. Yue, M. Ruhua, N. Rui, G. Cungang. Application 25.08.2021; publication 03.03.2023.

10. Yan M., An X., Duan S., Jiang Z., Liu X., Zhao X., et al. A comparative study on cross-linking of fibrillar gel prepared by tilapia collagen and hyaluronic acid with EDC/NHS and genipin // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022. Vol. 213. P. 639–650. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.006.

11. Pat. no. 116603104A, China. Preparation method and application of recombinant type III collagen-sodium hyaluronate double-crosslinked gel / C. Liang, L. Jianyong, C. Xiaochao. Application 09.06.2023; publication 18.08.2023.

12. Xie C., Schaefer L., Iozzo R.V. Global impact of proteoglycan science on human diseases // *iScience*. 2023. Vol. 26, no. 11. P. 108095. DOI: 10.1016/j.isci.2023.108095.

13. Zhang M., Ou X., Shi H., Huang W., Song L., Zhu J., et al. Isolation, structures and biological activities of medicinal glycoproteins from natural resources: a review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. Vol. 244. P. 125406. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125406.

14. Zhang Ch., Zhou Z., Fu S., Yu C., Irfan M., Su X. DNA nanoprobes for detection and imaging of glycoproteins // *Nano Today*. 2023. Vol. 51. P. 101893. DOI: 10.1016/j.nantod.2023.101893.

15. Deng Y., Ma L., Han Q., Yu C., Johnson-Buck A., Su X. DNA-templated timer probes for multiplexed sensing // *Nano Letters*. 2020. Vol. 20, no. 4. P. 2688–2694. DOI: 10.1021/acs.nanolett.0c00313.

16. Semenycheva L., Chasova V., Fukina D., Suleymanov E. Synthesis of polymethyl-methacrylate–collagen-graft copolymer using a complex oxide $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ photocatalyst // *Polymer Science, Series D*. 2022. Vol. 15. P. 110–117. DOI: 10.1134/S1995421222010166.

17. Chasova V., Semenycheva M., Egorkhina M., Charykova I., Linkova D., Rubtsova Y., et al. Cod gelatin as an alternative to cod collagen in hybrid materials for regenerative medicine // *Macromolecular Research*. 2022. Vol. 30. P. 212–221. DOI: 10.1007/s13233-022-0017-9.

18. Chasova V.O., Fukina D.G., Boryakov A.V., Koroleva E.V., Semenycheva L.L., Suleymanov E.V. The effect of methyl methacrylate transformations during photocatalysis in the presence of $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ on the change of the complex oxide surface // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2022. Т. 12. N 2. С. 208–221. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-2-208-221. EDN: STAHGQ.

19. Semenycheva L., Chasova V., Fukina D., Koryagin A., Belousov A., Valetova N., et al. Photocatalytic synthesis of materials for regenerative medicine using complex oxides with β -pyrochlore structure // *Life*. 2023. Vol. 13, no. 2. P. 352. DOI: 10.3390/life13020352.

20. Semenycheva L., Chasova V., Sukhareva A., Fukina D., Koryagin A., Valetova N., et al. New composite materials with cross-linked structures based on grafted copolymers of acrylates on cod collagen // *Applied Sciences*. 2023. Vol. 13, no. 9. P. 5455. DOI: 10.3390/app13095455.

21. Semenycheva L., Chasova V., Matkivskaya J., Fukina D., Koryagin A., Belaya T., et al. Features of polymerization of methyl methacrylate using a photocatalyst – the complex oxide $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ // *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 2021. Vol. 31. P. 3572–3583. DOI: 10.1007/s10904-021-02054-6.

22. Walling C. Free radicals in solution. New York: Wiley, 1957. 631 p.

23. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press, 1999. 936 p.

24. Розанцев Э.Г., Шолле В.Д. Органическая химия свободных радикалов: монография. М.: Химия, 1979. 344 с.

25. Fukina D.G., Koryagin A.V., Koroleva A.V., Zhizhin E.V., Suleimanov E.V., Kirillova N.I. Photocatalytic properties of β -pyrochlore $\text{RbTe}_{1.5}\text{W}_{0.5}\text{O}_6$ under visible-light irradiation // *Journal of Solid State Chemistry*. 2021. Vol. 300. P. 122235. DOI: 10.1016/j.jssc.2021.122235.

26. Пат. № 2567171, Российская Федерация, С08Н 1/06, А23J 1/04. Способ получения уксусной дисперсии высокомолекулярного рыбного коллагена / Л.А. Семеннычева, 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.

27. Копелев П.В., Нащекина Ю.А., Александрова С.А. Сравнительный анализ трехмерных полилактидных скаффолдов различной пористости, предназначенных для восстановления хрящевой ткани // Бюллетень инновационных технологий. 2018. Т. 2. № 3. С. 25–31. EDN: XWXOSL.

28. Садовой М.А., Ларионов П.М., Самохин А.Г., Рожнова О.М. Клеточные матрицы (скаффолды) для целей регенерации кости: современное состояние проблемы // Хирургия позвоночника. 2014. № 2. С. 79–86. DOI: 10.14531/ss2014.2.79-86. EDN: YSREXR.

29. Semenychева 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.

30. Semenychева L.L., Kuleshova N.V., Mitin A.V., Belaya T.A., Mochkina D.V. Molecular weight characteristics and sorption properties of pectin extracted from different substrates // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. № 4. С. 728–737. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-4-728-737. EDN: KMLLHY.

31. Элизян Г.А., Маркарян С.М., Пароникян А.Е., Маргарян Л.Ю. Исследование биоцидной обработки кожи средневековых книжных переплетов методом додубливания алюминиевым комплексом, стабилизированным триметилфосфатом // Вестник Национального политехнического университета Армении: Металлургия, материаловедение, недропользование. 2021. № 1. С. 82–88. DOI: 10.53297/18293395-2021.1-82. EDN: HLLTTY.

32. Пат. № 2777896C1, Российская Федерация, А61L2/00, С08Н1/00, С01D17/00. Способ получения привитого сополимера метилметакрилата на коллаген / Е.В. Сулейманов, В.О. Часова, Н.Б. Валетова, Л.А. Семеннычева, Д.Г. Фукина, А.В. Корягин [и др.]. Заявл. 28.10.2021; опубл. 11.08.2022. Бюл. № 23.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ludmila L. Semenychева,
Dr. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
Head of Research Laboratory,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603950,
Russian Federation,
✉ llsem@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3413-2899>

Veronika V. Prodaevich,
Postgraduate Student,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603950,
Russian Federation,
prodaevitchnika@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0003-8814-5828>

Victoria O. Rumyantseva,
Junior Researcher,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603950,
Russian Federation,
tchasowa.vika@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8038-8441>

Diana G. Fukina,
Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603950,
Russian Federation,
dianafuk@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8375-6863>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Семеннычева Людмила Леонидовна,
д.х.н., старший научный сотрудник,
заведующий научно-
исследовательской лабораторией,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
✉ llsem@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3413-2899>

Продаевич Вероника Владимировна,
аспирант,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
prodaevitchnika@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0003-8814-5828>

Румянцева Виктория Олеговна,
младший научный сотрудник,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
tchasowa.vika@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8038-8441>

Фукина Диана Георгиевна,
к.х.н., научный сотрудник,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
dianafuk@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-8375-6863>

Andrey V. Koryagin,

Junior Researcher,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603950,
Russian Federation,
kor-andrey14@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4858-3351>

Natalia B. Valetova,

Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603950,
Russian Federation,
nata-bor-2005@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2074-6304>

Olga N. Smirnova,

Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603950,
Russian Federation,
biodeg@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1811-8993>

Evgeny V. Suleimanov,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Director of the Research Institute,
Lobachevsky State University
of Nizhny Novgorod,
23, Gagarin Ave., Nizhny Novgorod, 603950,
Russian Federation,
suev@unn.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9292-4355>

Contribution of the authors

Ludmila L. Semenycheva – conceptualization, research methodology development, scientific management, data analysis and interpretation, writing and editing the text of manuscript.
Veronika V. Prodaevich – conducting experiments, data processing, results discussing, visualization, editing the text of manuscript.
Victoria O. Rummyantseva – conducting experiments, data processing, results discussing, editing the text of manuscript.
Diana G. Fukina – scanning electron microscopy, visualization, editing the text of manuscript.
Andrey V. Koryagin – photocatalyst synthesis, results processing.
Natalia B. Valetova – data validation, results processing.
Olga N. Smirnova – conducting and describing experiments on fungal resistance.
Evgeny V. Suleimanov – conceptualization, project administration, obtaining financing.

Корягин Андрей Владимирович,

младший научный сотрудник,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
kor-andrey14@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4858-3351>

Валетова Наталья Борисовна,

к.х.н., старший научный сотрудник,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
nata-bor-2005@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2074-6304>

Смирнова Ольга Николаевна,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
biodeg@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1811-8993>

Сулейманов Евгений Владимирович,

д.х.н., профессор, директор научно-исследовательского института,
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23,
Российская Федерация,
suev@unn.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9292-4355>

Вклад авторов

Л.Л. Семеновичева – концептуализация, разработка методологии исследования, научное руководство исследованием, анализ и интерпретация данных, написание и редактирование текста статьи.
В.В. Продаевич – проведение экспериментов, обработка полученных данных, обработка и обсуждение результатов, подготовка иллюстраций, редактирование текста статьи.
В.О. Румянцева – проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов, редактирование текста статьи.
Д.Г. Фукина – анализ методом сканирующей электронной микроскопии, подготовка иллюстраций, редактирование текста статьи.
А.В. Корягин – синтез фотокатализатора, обработка результатов.
Н.Б. Валетова – валидация данных, обработка результатов.
О.Н. Смирнова – проведение и описание экспериментов по грибостойкости.
Е.В. Сулейманов – концептуализация, администрирование проекта, получение финансирования.

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

Поступила в редакцию 29.05.2024.
Одобрена после рецензирования 22.11.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 29.05.2024.
Одобрена после рецензирования 22.11.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

Научная статья
УДК 579.26:579.6
EDN: AQLWEO
DOI: 10.21285/achb.941



Частота встречаемости cry-подобных генов в штаммах *Bacillus thuringiensis* Крымской коллекции микроорганизмов

А.В. Крыжко

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма,
Симферополь, Российская Федерация

Аннотация. Энтомопатогенные штаммы *Bacillus thuringiensis* используются для разработки биопрепаратов нового поколения против листогрызущих вредителей. Целью проведенного исследования было изучение частоты встречаемости cry-подобных генов в штаммах и выбор перспективного для создания на его основе энтомопатогенного биопрепарата. Материалом для исследования послужили энтомопатогенные штаммы *Bacillus thuringiensis*, полученные из Крымской коллекции микроорганизмов Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма. Энтомопатогенное действие перспективных штаммов изучали в ходе лабораторных опытов на личинках представителей отрядов Coleoptera, Lepidoptera. В качестве наиболее перспективных, содержащих не менее четырех генов токсинообразования, отобраны штаммы *Bacillus thuringiensis* 708 (cry1, thuE, cry7-8, cry11), 942 (cry1, thuE, cry11, vip), 949 (cry1, thuE, cry4, cry7-8), 989 (cry1, thuE, cry11, vip), 0162 (cry1, thuE, cry11, vip), 0307 (cry1, thuE, cry4, cry7-8), 0308 (cry1, thuE, cry4, cry7-8), 0363 (cry1, thuE, cry5, cry11) и 0371 (cry1, thuE, cry9, cry11). Установлено, что выделенные штаммы *Bacillus thuringiensis* 0162, 0307, 0363 и 0371 оказывают высокое энтомопатогенное действие против личинок колорадского жука, ильмового листопада (88,3–100%), гусениц плодовой моли, капустной совки, златогузки и американской бабочки (92,3–100%). Показано, что штамм *Bacillus thuringiensis* 0371 проходит все классические фазы развития и в течение 45–48 ч демонстрирует полный выход кристаллов и спор из спорангия. Таким образом, штамм 0371 перспективен для разработки регламента производства биопрепарата для защиты сельскохозяйственных растений.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, cry-подобные гены, листогрызущие вредители, Coleoptera, Lepidoptera

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № FNZW-2022-0006.

Для цитирования: Крыжко А.В. Частота встречаемости cry-подобных генов в штаммах *Bacillus thuringiensis* Крымской коллекции микроорганизмов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 567–577. DOI: 10.21285/achb.941. EDN: AQLWEO.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Frequency of cry-like genes in *Bacillus thuringiensis* strains of the Crimean microorganism collection

Anastasiia V. Kryzhko

Research Institute of Agriculture of Crimea, Simferopol, Russian Federation

Abstract. The entomopathogenic strains of *Bacillus thuringiensis* are used in the development of new-generation biopreparations against leaf-eating insects. The present study was aimed at analyzing the frequency of cry-like genes in the strains and at identifying a promising strain for the development of an entomopathogenic biopreparation on its basis. The study materials included the entomopathogenic strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from the Crimean microorganism collection of the Crimean Agricultural Research Institute. The entomopathogenic effect

of promising strains was studied in laboratory experiments on Coleoptera and Lepidoptera larvae. The following strains of *Bacillus thuringiensis* were identified as the most promising, i.e., containing at least four toxin genes: 708 (cry1, thuE, cry7-8, cry11), 942 (cry1, thuE, cry11, vip), 949 (cry1, thuE, cry4, cry7-8), 989 (cry1, thuE, cry11, vip), 0162 (cry1, thuE, cry11, vip), 0307 (cry1, thuE, cry4, cry7-8), 0308 (cry1, thuE, cry4, cry7-8), 0363 (cry1, thuE, cry5, cry11) и 0371 (cry1, thuE, cry9, cry11). The isolated strains of *Bacillus thuringiensis* 0162, 0307, 0363, and 0371 were found to have a high entomopathogenic effect on the larvae of the Colorado potato beetle and elm-leaf beetle (88.3–100%), as well as the caterpillars of ermine moth, cabbage moth, brown-tail moth, and fall webworm (92.3–100%). It is shown that *Bacillus thuringiensis* strain 0371 goes through all traditional stages of development and exhibits complete release of crystals and spores from the sporangium within 45–48 h. Thus, strain 0371 can be used to develop specifications for manufacturing a plant protection biopreparation.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, cry-like genes, leaf-eating insects, Coleoptera, Lepidoptera

Funding. The work was financially supported by the state assignment no. FNZW-2022-0006.

For citation: Kryzhko A.V. Frequency of cry-like genes in *Bacillus thuringiensis* strains of the Crimean microorganism collection. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):567-577. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.941. EDN: AQLWEO.

ВВЕДЕНИЕ

Вопрос получения новых перспективных биопрепаратов, эффективных против листогрызущих вредителей, не теряет своей актуальности. На рынке современных биопрепаратов доминируют препараты на основе энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis*. Промышленные препараты данного типа эффективны против более 400 видов насекомых из семейств Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Orthoptera [1, 2]. Основная часть биопрепаратов разрабатывается на основе *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* (Битоксибациллин, Битоксин и др.) и применяется против комплекса листогрызущих насекомых на овощных, плодово-ягодных культурах, в садово-парковых насаждениях и в лесах [3].

Существуют несколько причин развития интереса к *B. thuringiensis*. Данная группа бактерий обладает специфическим действием на насекомых-вредителей, использование *B. thuringiensis* не вызывает стойкого загрязнения почвы, листьев и воздуха энтомопатогенными бактериями. Ко всему прочему, *B. thuringiensis* является естественным компонентом биоценозов, она безопасна для энтомофагов и не является патогенной для млекопитающих и человека [4]. Именно широким использованием *B. thuringiensis* в практике контроля вредителей, их селективным действием, безопасностью относительно компонентов агроценоза и здоровья человека обусловлена необходимость поиска и изучения новых штаммов [5]. Кроме того, штаммы с высокими энтомопатогенными и технологическими свойствами используются для разработки биопрепаратов нового поколения, а также в качестве аналогов уже существующих штаммов-продуцентов [6].

Действие *B. thuringiensis* на насекомых связано как с инфекционным процессом, так и с образованием токсических веществ. Некоторые из этих факторов вирулентности являются общими для представителей группы *B. cereus*, например циттермицин А, гемолизин, гемолитический комплекс и часть энтеротоксинов [7, 8]. Другие характерны исключительно для *B. thuringiensis* – это Cyt- и Cry-эндотоксины. *B. thuringiensis* представляет собой грамположительные спорообразующие бактерии, способные формировать при споруляции параспоральные кристаллические включения белковой природы, Cry- и Cyt-токсины, которые обуславливают главным образом их инсектицидную активность [9]. В период

вегетативного роста некоторые штаммы *B. thuringiensis* продуцируют инсектицидные белки (Vip- и Sip-токсины), которые секретируются в среду. Впервые Vip-токсины были обнаружены в середине 1990-х годов, на данный момент описано 176 Vip-токсинов, распределенных на 4 класса: Vip 1, Vip 2, Vip 3 и Vip 4 [10]. Обширные исследования *in vitro* и *in vivo* показали почти полное отсутствие перекрестной резистентности между Vip3A-и Cry1-белками [11]. Наличие Vip3-токсинов открывает возможность использования биопестицидов на основе *B. thuringiensis* в отношении большего числа вредителей, а также препятствует развитию устойчивости насекомых к Cry-белкам [12, 13].

Основное значение в энтомоцидном действии бактерий традиционно уделяется кристаллическим белковым параспоральным Cyt- и Cry-включениям, формируемым клетками бактерий во время фазы стационарного роста.

На сегодняшний день Комитет по номенклатуре токсинов *B. thuringiensis* [14] классифицировал 73 различных типа инсектицидных белков (от Cry1 до Cry74) и доказал токсичность данных белков против Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera, нематод (как паразитов человека и животных, так и свободноживущих Rhabditida) некоторых улиток (Gastropoda) [15–18] и/или раковых клеток человека различного происхождения [19]. Таким образом, вопросы идентификации генов *B. thuringiensis*, ответственных за энтомоцидную активность и дифференциацию бактерий *B. thuringiensis* на основе физиолого-биохимических свойств, представляют определенный научно-практический интерес. Идентификация cry-генов, кодирующих Cry-белки штаммов Крымской коллекции микроорганизмов Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма могла бы способствовать не только определению одного из ключевых факторов вирулентности, но и попытке систематизировать перспективные для создания биопрепарата против листогрызущих насекомых штаммы коллекции по спектру действия эндотоксинов [20].

Целью проведенных исследований являлось изучение частоты встречаемости cry-подобных генов в штаммах энтомоцидной бактерии *B. thuringiensis* Крымской коллекции микроорганизмов, а также выбор перспективного биоагента для создания на его основе энтомопатогенного биопрепарата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом для исследования генов *B. thuringiensis*, ответственных за синтез инсектицидных кристаллических белков, послужили штаммы *B. thuringiensis*, зарегистрированные в Крымской коллекции микроорганизмов Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма, зарегистрированной на сайте «Научно-технологическая инфраструктура Российской Федерации» под номером 507484¹. В качестве позитивного контроля использовали полученные из лаборатории протеомики надорганизменных систем Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии штаммы *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 41 (H₁) и *B. thuringiensis* var. *darmstadensis* 109 (H₁₀), содержащие гены *thuE*, *cry1* и *cry11*, а в качестве позитивного контроля для генов *cry2*, *cry5* и *vip* использовали штамм 358 коллекции Института систематики и экологии животных СО РАН, за что автор статьи выражает благодарность авторам штаммов. Наличие соответствующих генов в геноме контрольных штаммов устанавливали путем поиска соответствующих нуклеотидных последовательностей при помощи алгоритма BLAST [21].

Выделение тотальной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из вегетативной массы клеток бактерий *B. thuringiensis* провели согласно общепринятым методам [22]. Качество выделенной ДНК проверяли с помощью анализа методом полимеразной цепной реакции с использованием стандартных бактериальных праймеров ITS-16S – 1392-S-15 (5' – GNACA-

CACCGCCCGT – 3') и ITS-23S-206-A-21 (5' – NCTTAGAT-GTTTCAGTTCVCY – 3' [23]. Детекцию гена энтомоцидной активности *cry1* в штаммах *B. thuringiensis* проводили при помощи пары праймеров *cry1*-543, упоминавшихся в работах А. Браво [24], нацеленных на одноименные гены, расположенные на плазмидной ДНК бактерии (табл. 1). Для детекции генов энтомоцидных белков классов Cry2, Cry3, Cry4, Cry5, Cry7-8, Cry9, Cry11, Vip, *thuE* пользовались праймерами Un2, Un3, Un4, Un5, Un7-8, Un9, Un11, Vip и BE [5, 25]. Объем реакционной смеси составил 25 мкл и включал: 5 мкл Screen Mix-HS («Евроген»), содержащей 3 mM MgCl₂ и 0,12 mM dNTPs; а также 50 нг бактериальной ДНК, 0,2 мкл каждого праймера (5 pM/мкл). ПЦР проводили с использованием следующей программы: 1 мин начальная денатурация при 95 °C, затем 35 циклов – 30 с, денатурация при 94 °C, 30 с отжиг при целевой температуре отжига и 1 мин элонгация при 72 °C, и заключительная элонгация 1 мин при 72 °C. ПЦР продукты визуализировали с помощью электрофореза в 1,5%-м агарозном геле [26].

Энтомопатогенное действие перспективных штаммов изучали в лабораторных опытах на личинках колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptera) и ильмового листоеда (*Xanthogaleruca luteola* (Stål), Coleoptera), гусеницах капустной совки (*Mamestra brassicae*, Lepidoptera), плодовой моли, златогузки и американской белой бабочки (*Hyphantria cunea* Dryr., Lepidoptera). Лабораторные опыты по изучению энтомоцидной активности штаммов *B. thuringiensis* проводили в литровых стаканах, куда помещали

Таблица 1. Характеристика праймеров, используемых в исследованиях по идентификации генов энтомоцидной активности в геноме штаммов *Bacillus thuringiensis*

Table 1. Characteristics of primers used in studies of insecticidal activity genes identification in the genome of *Bacillus thuringiensis* strains

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Длина ампликона, bp	Температура отжига, °C
Un1F	CATGATTCATGCGGCAGATAA AC	200	57
Un1R	TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT		
Un2F	GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG	689–701	57
Un2R	CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT		
Un3F	CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC	589–604	54
Un3R	GCGTGACATACCCATTTCAGGTCC		
Un4F	GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC	439	60
Un4R	GCGTGACATACCCATTTCAGGTCC		
Un5F	TTACGTAAATTGGTCAATCAAGCAAA	474–489	54
Un5R	AAGACCAAATTCATACCAAGGGTT		
Un7-8F	AAGCAGTGAATGCCTTGTTTAC	420	48
Un7-8R	CTTCTAAACCTTGACTACTT		
Un9F	CGGTGTACTATTAGCGAGGGCGG	351–359	60
Un9R	GTTTGAGCCGCTTCACAGCAATCC		
Un11F	TTCCAACCCAACTTTCAAGC	305	54
Un11R	AGCTATGGCCTAAGGGGAAA		
VipF	CCTCTATGTTGAGTGATGTA	1000	50
VipR	CTATACTCCGCTTCACTTGA		
BEF	AAAGGGTCTGGTAAAACA	406	54
BER	ACCATCGACTTCTCTTCTT		

¹ Крымская коллекция микроорганизмов // Научно-технологическая инфраструктура Российской Федерации. Режим доступа: <http://ckp-rf.ru/usu/507484/> (дата обращения: 16.04.2024).

личинки или гусеницы 1-2 возраста и листья кормового растения, обработанные жидкой культурой штаммов при титре спор 200 млн/мл. Обработанным кормом личинки питались 3 суток, после чего его меняли на необработанный. Жидкие споровые культуры получали при культивировании бактерий на технологических качалках в дрожже-полисахаридной среде, в состав которой входили следующие компоненты, %: дрожжи кормовые – 3,0, мука кукурузная – 1,5. Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл с 35 мл питательной среды. Опыты проводили в 3 повторностях по 25 личинок в каждой. В качестве эталона использовали жидкую споровую культуру штамма *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* 98 (продуцент Битоксибациллина) и штамма *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 0293 (продуцент Лепидоцида).

Статистическую обработку полученных результатов провели с применением современных методов статистических исследований с применением Microsoft Excel и ППП Statistica 7 [27], Jupyter Notebook и языка программирования Python, прикладных библиотек numpy, matplotlib [28, 29].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гены токсинообразования определяли в 61 штамме *B. thuringiensis* коллекции энтомопатогенов отдела сельскохозяйственной микробиологии ФГБУН «НИИСХ Крыма».

Детекцию генов энтомоцидной активности группы *cry*, *thuE* и *vip* в штаммах *B. thuringiensis* проводили с помощью классической ПЦР (табл. 2, рис. 1–5). В результате исследований с применением праймеров Un1 было установлено наличие генов класса *cry1* в геноме штаммов



Рис. 1. Гель-электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции, полученных в результате амплификации дезоксирибонуклеиновой кислоты штаммов *Bacillus thuringiensis* с праймерами Un1 (М – маркер длин дезоксирибонуклеиновых кислот (50+ bp DNA Ladder, «Евроген»); в верхней строчке указаны номера исследуемых штаммов и названия праймеров)

Fig. 1. Gel electrophoresis of polymerase chain reaction products obtained as a result of deoxyribonucleic acid amplification of *Bacillus thuringiensis* strains with Un1 primers (M – 50+ bp DNA Ladder, “Eurogen”; the top line shows the numbers of the studied strains and the names of the primers)

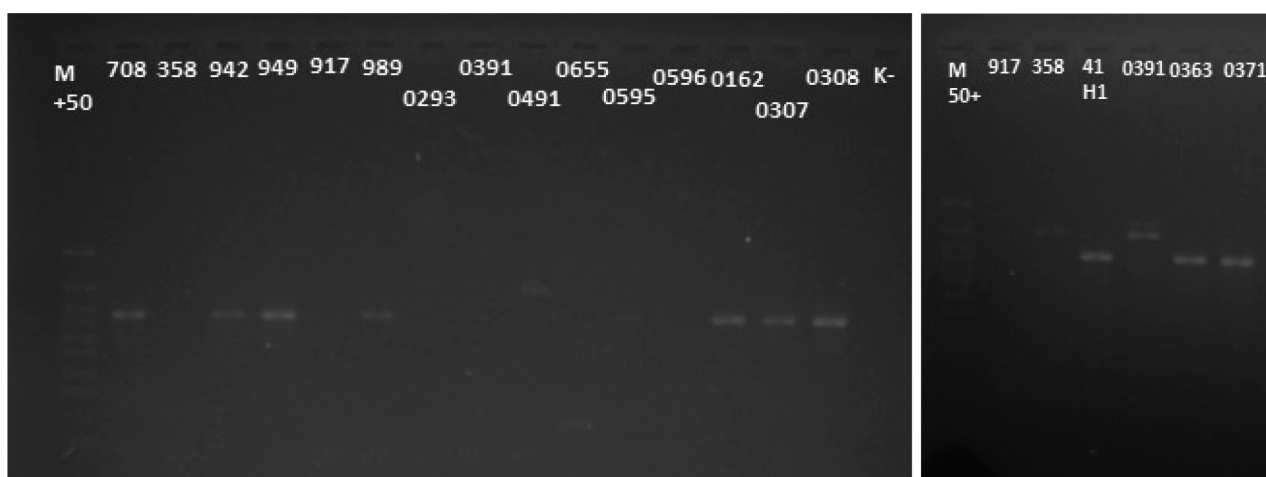


Рис. 2. Гель-электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции, полученных в результате амплификации дезоксирибонуклеиновой кислоты штаммов *Bacillus thuringiensis* с праймерами BE (М – маркер длин дезоксирибонуклеиновых кислот (50+ bp DNA Ladder, «Евроген»); в верхней строчке указаны номера исследуемых штаммов и названия праймеров)

Fig. 2. Gel electrophoresis of polymerase chain reaction products obtained as a result of deoxyribonucleic acid amplification of *Bacillus thuringiensis* strains with BE primers (M – 50+ bp DNA Ladder, “Eurogen”; the top line shows the numbers of the studied strains and the names of the primers)

Таблица 2. Наличие энтомоцидных и cry-подобных генов в штаммах *Bacillus thuringiensis*

Table 2. Presence of entomocidal and cry-like genes in strains of *Bacillus thuringiensis*

Штамм	Гены энтомоцидных белков <i>Bacillus thuringiensis</i>									β -экзотоксин	Серотип
	cry1	thuE	cry2	cry4	cry5	cry7-8	cry9	cry11	vip		
98	0	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
202	0	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
685	0	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
708	1	1	0	0	0	1	0	1	0	+	thuringiensis
787	1	1	0	0	0	0	0	1	0	-	H/o
792	1	1	0	0	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
800	1	1	0	0	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
810	0	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
815	0	1	0	0	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
820	1	1	0	0	0	1	0	0	0	+	darmstadiensis
836	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-	dendrolimus
854	1	1	0	0	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
888	1	1	0	0	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
902	0	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
917	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-	kurstaki
926	1	1	0	1	0	1	0	0	0	-	kurstaki
942	1	1	0	0	0	0	0	1	1	-	dendrolimus
949	1	1	0	1	0	1	0	0	0	-	H/o
989	1	1	0	0	0	0	0	1	1	+	thuringiensis
994	1	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
10/H	0	1	0	1	0	0	0	1	0	-	dendrolimus
39/H	0	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
42/H	0	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
014	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-	H/o
048	0	1	0	1	0	0	0	0	0	-	H/o
072	1	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0105	1	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0120	0	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0161	0	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0162	1	1	0	0	0	0	0	1	1	+	thuringiensis
0164	1	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0177	0	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0198	0	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0271	1	1	0	0	0	0	0	0	0	+	darmstadiensis
0279	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	darmstadiensis
0293	1	0	0	1	0	0	0	0	0	+	kurstaki
0304	0	1	0	1	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
0307	1	1	0	1	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
0308	1	1	0	1	0	1	0	0	0	+	kurstaki
0326	1	1	0	1	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
0332	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
0337	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
0352	0	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
0361	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
0363	1	1	0	0	1	0	0	1	0	+	thuringiensis
0371	1	1	0	0	0	0	1	1	0	+	thuringiensis
0374	1	1	0	0	0	1	0	0	0	+	thuringiensis
0376	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
0379	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	kurstaki
0399	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	H/o
0391	0	0	0	0	0	0	0	1	0	+	kurstaki
0409	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	H/o
0411	1	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
ЛП	1	1	0	0	1	0	0	0	0	+	thuringiensis
109-C	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	morizoni
Z-52	1	1	0	1	0	0	0	1	0	+	kurstaki
358	1	0	1	0	1	0	0	1	1	-	kurstaki
4301	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
202-16	0	1	0	0	0	0	0	0	0	+	thuringiensis
41H1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	thuringiensis
109H10	1	1	0	0	0	0	0	1	0	+	darmstadiensis

Примечание. H/o – не обнаружен.

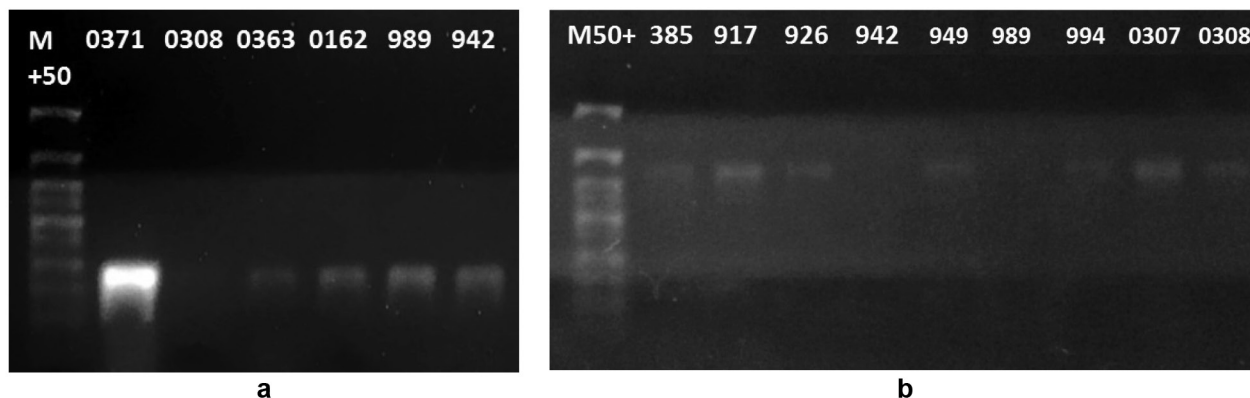


Рис. 3. Гель-электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции, полученных в результате амплификации дезоксирибонуклеиновой кислоты штаммов *Bacillus thuringiensis*: а – с праймерами Un11; б – с праймерами Un4 (М – маркер длин дезоксирибонуклеиновых кислот (50+ bp DNA Ladder, «Евроген»); в верхней строчке указаны номера исследуемых штаммов и названия праймеров)

Fig. 3. Gel electrophoresis of polymerase chain reaction products obtained as a result of deoxyribonucleic acid amplification of *Bacillus thuringiensis* strains with: а – Un11 primers; б – Un4 primers (M – 50+ bp DNA Ladder, “Eurogen”; the top line shows the numbers of the studied strains and the names of the primers)

B. thuringiensis 708, 787, 792, 800, 820, 854, 888, 926, 942, 949, 989, 994, 072, 0105, 0162, 0164, 0271, 0279, 0293, 0307, 0308, 0326, 0332, 0337, 0361, 0363, 0371, 0374, 0376, 0379, 0399, 0409, 0411, ЛП, 109-С, Z-52, 358, 4301, 41Н1, 109Н10. При помощи пары праймеров *ThuE* было установлено наличие гена *thu* субъединицы *E* в геноме штаммов *B. thuringiensis* 98, 202, 685, 708, 787, 792, 800, 810, 815, 820, 836, 854, 888, 902, 926, 942, 949, 989, 994, 10/Н, 39/Н, 42/Н, 014, 048, 072, 0105, 0120, 0161, 0162, 0164, 0177, 0198, 0271, 0279, 0293, 0304, 0307, 0308, 0326, 0332, 0337, 0352, 0361, 0363, 0371, 0374, 0376, 0379, 0399, 0409, 0411, ЛП, 109-С, Z-52, 4301, 202-16, 41Н1, 109Н10.

Анализ коллекционных штаммов позволил установить, что ген класса *cry2* был детектирован только

в геноме штамма *B. thuringiensis* 358. Генов класса *cry3* в исследованных штаммах не обнаружено. Установлено наличие генов класса *cry4* в геномах штаммов *B. thuringiensis* 917, 926, 949, 10/Н, 39/Н, 42/Н, 048, 072, 0105, 0120, 0164, 0177, 0293, 0304, 0307, 0308, 0326, Z-52. Гены, кодирующие энтомоцидный кристаллический белок, принадлежащий к классу *cry5*, обнаружили в геномах штаммов *B. thuringiensis* 0363, ЛП, 358. Гены класса *cry7-8* детектированы в геномах штаммов *B. thuringiensis* 708, 792, 800, 815, 820, 854, 888, 926, 949, 0304, 0307, 0308, 0326, 0374. Установлено наличие гена класса *cry9* в геноме штамма *B. thuringiensis* 0371. Наиболее распространенными в штаммах *B. thuringiensis* Крымской коллекции оказались гены класса *cry11*. Они были отмечены в геномах

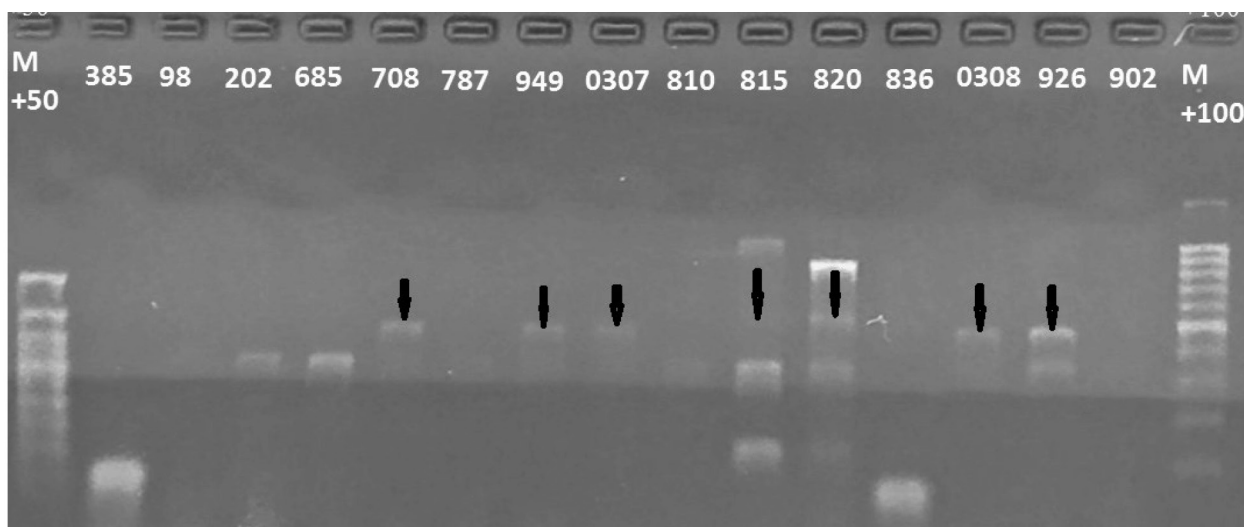


Рис. 4. Гель-электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции, полученных в результате амплификации дезоксирибонуклеиновой кислоты штаммов *Bacillus thuringiensis* с праймерами Un7-8 (М – маркер длин дезоксирибонуклеиновых кислот (50+ bp DNA Ladder, «Евроген»); в верхней строчке указаны номера исследуемых штаммов и названия праймеров, стрелочками показаны целевые фрагменты)

Fig. 4. Gel electrophoresis of polymerase chain reaction products obtained as a result of deoxyribonucleic acid amplification of *Bacillus thuringiensis* strains with Un7-8 primers (M – 50+ bp DNA Ladder, “Eurogen”; the top line shows the numbers of the studied strains and the names of the primers, target fragments are shown with arrows)

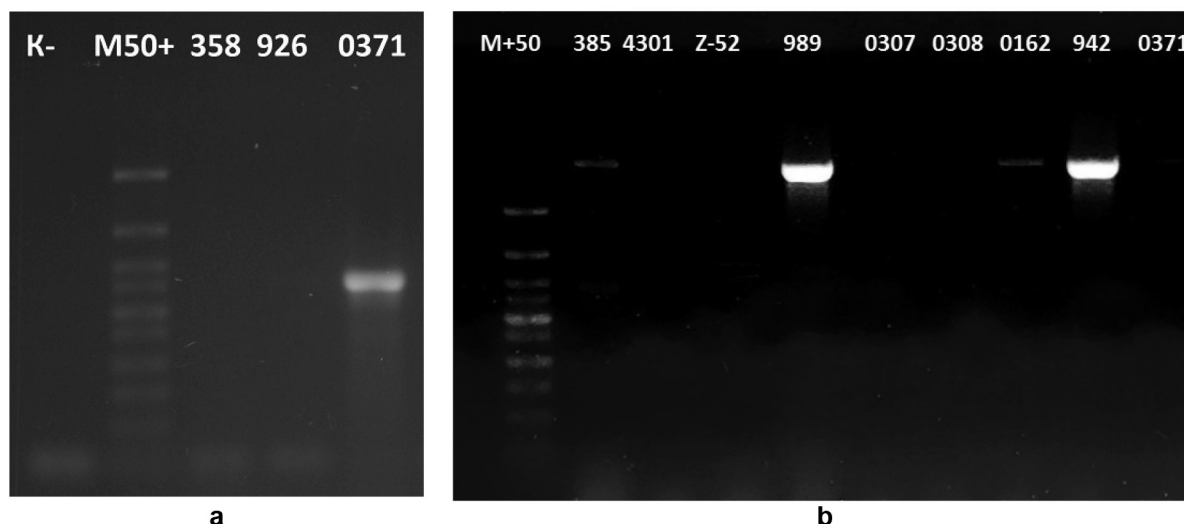


Рис. 5. Гель-электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции, полученных в результате амплификации дезоксирибонуклеиновой кислоты штаммов *Bacillus thuringiensis*: а – с праймерами Un9; б – с праймерами Vip (М – маркер длин дезоксирибонуклеиновых кислот (50+ bp DNA Ladder, «Евроген»); в верхней строчке указаны номера исследуемых штаммов и названия праймеров)

Fig. 5. Gel electrophoresis of polymerase chain reaction products obtained as a result of deoxyribonucleic acid amplification of *Bacillus thuringiensis* strains with: а – Un9 primers; б – Vip primers (M – 50+ bp DNA Ladder, “Eurogen”; the top line shows the numbers of the studied strains and the names of the primers)

штаммов *B. thuringiensis* 202, 685, 708, 787, 902, 942, 989, 10/Н, 0162, 0332, 0337, 0352, 0361, 0363, 0371, 0376, 0379, 0399, 0391, 0409, 109-С, Z-52, 358, 4301, 41Н1, 109Н10. Показано наличие генов класса Vip в геномах штаммов *B. thuringiensis* 942, 989, 0162, 358.

Анализ частоты встречаемости генов токсинообразования позволил установить, что большая часть коллекции (95,1%) имеет в геноме ген экзотоксина, что свидетельствует о высокой активности коллекции энтомопатогенных штаммов против вредителей из отрядов Hemiptera и Lepidoptera (табл. 3). Следует заметить, что ген *thuE* детектирован у штаммов 836, 942, 10/Н, 0308, 0379, 0391, Z-52, относящихся к серотипам *kurstaki* и *dendrolimus*, для которых биохимическими методами установлено отсутствие экзотоксина. Вероятно, это связано с тем, что, несмотря на наличие аппарата синтеза, искомый токсин не синтезируется в значительных количествах. Основная часть коллекции содержит в геноме ген *cry1* (63,9%), активный против вредителей из отрядов Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Gastropoda. 44,2% штаммов, имеющих ген *cry11*, потенциально активны против вредителей из отрядов Diptera и Hemiptera. 29,5% штаммов *B. thuringiensis*, имеющих в геноме ген *cry4*, потенциально активны против Diptera. Также 21,3% штаммов имеют в геноме *cry7-8* и могут быть активны против Lepidoptera и Coleoptera.

Установлено, что в коллекции *B. thuringiensis* присутствуют штаммы, потенциально активные против Hymenoptera, Rhabditida и имеющие ген *cry5* (4,91%). 6,55% штаммов имеют в геноме гены группы *vip*. Гены *cry2* и *cry9* представлены в коллекции не более чем в 1,6% штаммов. Гены *cyt1* и *cyt2* при помощи изученных праймеров не обнаружены.

Основным результатом данных поисковых исследований стал отбор перспективных штаммов *B. thuring-*

iensis коллекции, содержащих не менее четырех генов токсинообразования. Ими оказались штаммы 708 (*cry1*, *thuE*, *cry7-8*, *cry11*), 942 (*cry1*, *thuE*, *cry11*, *vip*), 949 (*cry1*, *thuE*, *cry4*, *cry7-8*), 989 (*cry1*, *thuE*, *cry11*, *vip*), 0162 (*cry1*, *thuE*, *cry11*, *vip*), 0307 (*cry1*, *thuE*, *cry4*, *cry7-8*), 0308 (*cry1*, *thuE*, *cry4*, *cry7-8*), 0363 (*cry1*, *thuE*, *cry5*, *cry11*) и 0371 (*cry1*, *thuE*, *cry9*, *cry11*).

Таблица 3. Частота встречаемости cry-подобных генов в штаммах *Bacillus thuringiensis*

Table 3. Frequency of cry-like genes occurrence in *Bacillus thuringiensis* strains

Ген	Частота, %	Отряды целевых вредителей
<i>cry1</i>	63,9	Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Gastropoda
<i>thuE</i>	95,1	Hemiptera, Lepidoptera
<i>cry2</i>	1,63	Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera
<i>cry4</i>	29,5	Diptera
<i>cry5</i>	4,91	Hymenoptera, Rhabditida
<i>cry7-8</i>	21,3	Lepidoptera, Coleoptera
<i>cry9</i>	1,6	Lepidoptera, Coleoptera
<i>cry11</i>	44,2	Diptera, Hemiptera
<i>cyt1</i>	0	Coleoptera, Diptera
<i>cyt2</i>	0	Coleoptera, Diptera
<i>vip</i>	6,55	Lepidoptera

В результате исследований энтомоцидной активности перспективных штаммов относительно спектра вредителей было установлено, что наиболее эффективными против колорадского жука и ильмового листодея являются штаммы *B. thuringiensis* 708, 989, 0162, 0363 и 0371 (табл. 4). Энтомоцидная активность данных штаммов относительно колорадского жука на 10-е сутки после

Таблица 4. Энтомоцидная активность штаммов *Bacillus thuringiensis* против распространенных листогрызущих вредителей овощных и декоративных насаждений Крыма

Table 4. Entomocidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against common leaf-eating pests of vegetable and ornamental plantings in the Crimea

Штамм	Гибель на 10-е сутки опыта, %					
	личинки колорадского жука (L_{1-2})	личинки ильмового листоеда (L_1)	гусеницы плодовой моли (L_{1-2})	гусеницы капустной совки (L_{1-2})	гусеницы златогузки (L_{1-2})	гусеницы американской белой бабочки (L_{1-2})
Контроль (вода)	6,7±0,1	11,6±1,6	0	2,7±0,1	0	5,3±0,3
98 (эталон)	92,3±0,1	81,6±1,6	100	93,3±0,1	100	100
0293 (эталон)	50,1±0,1	40,0±6,1	100	89,8±0,3	87,3±0,3	100
708	100	91,7±6,2	100	100	73,2±6,9	100
942	27,0±1,0	21,0±0,4	100	84,6±0,6	80,0±2,8	95,6±0,7
949	37,0±1,0	38,3±0,7	100	98,4±2,5	90,3±0,3	100
989	100	88,4±3,5	100	98,7±0,7	75,3±3,7	100
0162	100	98,2±6,6	100	100	100	100
0307	89,3±0,7	95,6±4,2	100	100	100	100
0308	22,0±0,3	18,3±0,2	100	81,7±1,4	97,1±3,4	100
0363	100	88,3±1,3	100	100	100	100
0371	100	94,2±0,4	100	92,3±0,7	98,7±0,3	100

обработки листьев составила в среднем 100%, а относительно ильмового листоеда – 92,5%. Самой высокой активностью против ильмового листоеда обладал штамм *B. thuringiensis* 0162 (98,2%). Все перспективные штаммы оказались высокоактивными против плодовой моли и американской белой бабочки. Штаммы *B. thuringiensis* 708, 0162 и 0307 оказались высокоактивными против гусениц капустной совки, вызывая их 100%-ю гибель на 7-е сутки эксперимента. Обработка корма штаммами *B. thuringiensis* 949, 989 и 0371 способствовала гибели в среднем 96,3% гусениц, а штаммами 942 и 0308 – в среднем 82,5% на 10-е сутки опыта. Максимальным энтомоцидным эффектом на гусениц златогузки обладали штаммы *B. thuringiensis* 0162 и 0307 (100%-я гибель на 10-е сутки опыта), высокую активность проявляют штаммы *B. thuringiensis* 0308 и 0371, вызывающие в среднем 97,5%-ю гибель вредителя в тот же срок. На основе анализа полученных результатов из всех исследуемых патогенов в качестве наиболее эффективных против вредителей отрядов Coleoptera и Lepidoptera были отобраны четыре штамма *B. thuringiensis*: 0162, 0307, 0363 и 0371.

Савокупность протестированных генов энтомоцидной активности в жидкой культуре (*cry1*, *thuE*, *cry9*, *cry11*) и высокая энтомоцидная активность показали перспективность дальнейшего изучения технологических параметров культивирования штамма *B. thuringiensis* 0371.

Энтомопатоген культивировали в дрожже-полисахаридной среде при температуре 28–30 °C на технологической качалке (220 об/мин) в течение 48 ч. Установлено, что для бактерий в стадии вегетативных клеток характерна кинетика роста и развития, которая состоит из 4 классических фаз: Lag-фазы, фазы ускорения роста, экспоненциальной и стационарной фаз. Lag-фаза развития бактерий проходит в течение 0,5–1,5 ч, а последующие фазы развития вегетативных клеток – до 10–12 ч (табл. 5). Титр колониеобразующих единиц за этот период достигает 0,5–0,8 млрд клеток в 1 мл жидкости.

Через 14–16 ч культивирования в вегетативных клетках отмечали начало активного формирования белковых кристаллов и спорогенных зон. Период массовой споруляции проходил через 20–24 ч. Весь период культивирования составлял 45–48 ч и заканчивался полным высвобождением спор из спорангиев. Конечный титр свободных спор достигает 2,0–2,7 млрд в 1 мл.

Таблица 5. Технологические показатели развития штамма *Bacillus thuringiensis* 0371 при культивировании в дрожже-полисахаридной среде

Table 5. Technological indicators of the strain *Bacillus thuringiensis* 0371 development when cultivated in a yeast-polysaccharide medium

Этап развития бактерий	Период наблюдений, ч
Этап 1. Начало образования спорогенных зон	14–16
Этап 2. Массовая споруляция	20–24
Этап 3. 10% свободных спор	28–30
Этап 4. Полный выход спор и кристаллов	45–48

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования установлено, что 95,1% штаммов коллекции имеют в геноме ген β -экзотоксина и 63,9% – ген *cry1*, что свидетельствует об их высокой активности против вредителей из отрядов Hemiptera и Lepidoptera. Описано наличие генов, потенциально активных против вредителей из отрядов Diptera и Hemiptera: *cry11* у 44,2% и *cry4* у 29,5% штаммов коллекции. Показано, что в коллекции *B. thuringiensis* присутствуют штаммы, потенциально активные против представителей отрядов Hymenoptera, Rhabditida и имеющие ген *cry5* (4,91%).

В качестве наиболее перспективных для создания на их основе биопрепаратов, содержащих не менее четырех генов токсинообразования, отобраны штаммы *B. thuringiensis* 708 (*cry1, thuE, cry7-8, cry11*), 942 (*cry1, thuE, cry11, vip*), 949 (*cry1, thuE, cry4, cry7-8*), 989 (*cry1, thuE, cry11, vip*), 0162 (*cry1, thuE, cry11, vip*), 0307 (*cry1, thuE, cry4, cry7-8*), 0308 (*cry1, thuE, cry4, cry7-8*), 0363 (*cry1, thuE, cry5, cry11*) и 0371 (*cry1, thuE, cry9, cry11*).

Установлено, что выделенные штаммы *B. thuringiensis* 0162, 0307, 0363 и 0371 оказывают высокое энтомопатогенное действие против личинок колорадского жука, ильмового листоеда (88,3–100%), гусениц

плодовой моли, капустной совки, златогузки и американской бабочки (92,3–100%).

Показано, что штамм *B. thuringiensis* 0371 является технологичным, так как проходит все классические фазы развития и в течение 45–48 ч демонстрирует полный выход кристаллов и спор из спорангия.

Таким образом, наличие генов энтомоцидной активности в жидкой культуре (*cry1, thuE, cry9, cry11*) и высокое энтомопатогенное действие характеризуют штамм *B. thuringiensis* 0371 как перспективный для разработки регламента производства биопрепарата для защиты сельскохозяйственных растений.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Arthurs S., Dara S.K. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States // Journal of Invertebrate Pathology. 2019. Vol. 165. P. 13–21. DOI: 10.1016/j.jip.2018.01.008.
2. Jouzani G.S., Valijanani E., Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings // Applied Microbiology and Biotechnology. 2017. Vol. 101. P. 2691–2711. DOI: 10.1007/s00253-017-8175-y.
3. Duarte Neto J.M.W., Wanderley M.C.A., da Silva T.A.F., Marques D.A.V., da Silva G.R., Gurgel J.F., et al. *Bacillus thuringiensis* endotoxin production: a systematic review of the past 10 years // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2020. Vol. 36. P. 128. DOI: 10.1007/s11274-020-02904-4.
4. Jo H., Tagele S.B., Pham H.Q., Kim M.-C., Choi S.-D., Kim M.-J., et al. Response of soil bacterial community and pepper plant growth to application of *Bacillus thuringiensis* KNU-07 // Agronomy. 2020. Vol. 10, no. 4. P. 551. DOI: 10.3390/agronomy10040551.
5. Perez M.P., Sauka D.H., Onco M.I., Berretta M.F., Benintende G.B. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae) larvae // Revista Argentina de Microbiología. 2017. Vol. 49, no. 3. P. 264–272. DOI: 10.1016/j.ram.2016.12.010.
6. Soleymani S., Sarrafzadeh M.-H., Mostoufi N. Modeling of fermentation process of *Bacillus thuringiensis* as a sporulating bacterium // Chemical Product and Process Modeling. 2019. Vol. 14, no. 2. P. 2018000. DOI: 10.1515/cppm-2018-0007.
7. Guttman D.M., Ellar D.J. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors // FEMS Microbiology Letters. 2000. Vol. 188, no. 1. P. 7–13. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09160.x.
8. Hansen B.M., Hendriksen N.B. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis // Applied and Environmental Microbiology. 2001. Vol. 67, no. 1. P. 185–189. DOI: 10.1128/AEM.67.1.185-189.2001.
9. Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity // Toxins (Basel). 2014. Vol. 6, no. 12. P. 3296–3325. DOI: 10.3390/toxins6123296.
10. Fang Y., Li Z., Liu J., Shu C., Wang X., Zhang X., et al. A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis* // Journal of Genetics and Genomics. 2011. Vol. 38, no. 12. P. 567–576. DOI: 10.1016/j.jgg.2011.11.001.
11. Lee M.K., Walters F.S., Hart H., Palekar N., Chen J.-S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin // Applied and Environmental Microbiology. 2003. Vol. 69, no. 8. P. 4648–4657. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4648-4657.2003.
12. Sena J.A., Hernández-Rodríguez C.S., Ferré J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites // Applied and Environmental Microbiology. 2009. Vol. 75, no. 7. P. 2236–2237. DOI: 10.1128/AEM.02342-08.
13. Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S.S., Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide // Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2011. Vol. 41, no. 7. P. 423–431. DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006.
14. Crickmore N., Zeigler D.R., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1998. Vol. 62, no. 3. P. 807–813. DOI: 10.1128/MMBR.62.3.807-813.1998.
15. Van Frankenhuyzen K. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins // Journal of Invertebrate Pathology. 2013. Vol. 114, no. 1. P. 76–85. DOI: 10.1016/j.jip.2013.05.010.
16. Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins // Toxins (Basel). 2014. Vol. 6, no. 4. P. 1222–1243. DOI: 10.3390/toxins6041222.
17. De Maagd R.A., Bravo A., Berry C., Crickmore N., Schnepf H.E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria // Annual Review of Genetics. 2003. Vol. 37. P. 409–433. DOI: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143042.
18. Chougule N.P., Bonning B.C. Toxins for transgenic resistance to hemipteran pests // Toxins (Basel). 2012. Vol. 4, no. 6. P. 405–429. DOI: 10.3390/toxins4060405.
19. Ohba M., Mizuki E., Uemori A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis* // Anticancer Research. 2009. Vol. 29, no. 1. P. 427–433.
20. Zheng J., Gao Q., Liu L., Liu H., Wang Y., Peng D., et al. Comparative genomics of *Bacillus thuringiensis* reveals a path to specialized exploitation of multiple invertebrate hosts // mBio. 2017. Vol. 8, no. 4. P. e00822-17. DOI: 10.1128/mBio.00822-17.
21. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // BMC Bioinformatics. 2012. Vol. 13. P. 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.
22. Franco-Rivera A., Benintende G., Cozzi J., Baizabal-Aguirre V.M., Valdez-Alarcón J.J., López-Meza J.E.

Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina // Antonie Van Leeuwenhoek. 2004. Vol. 86, no. 1. P. 87–92. DOI: 10.1023/B:ANTO.0000024913.94410.05.

23. Willumsen P.A., Johansen J.E., Karlson U. Isolation and taxonomic affiliation of N-heterocyclic aromatic hydrocarbon-transforming bacteria // Applied Microbiology and Biotechnology. 2005. Vol. 67, no. 3. P. 420–428. DOI: 10.1007/s00253-004-1799-8.

24. Bravo A., Sarabia S., Lopez L., Ontiveros H., Abarca C., Ortiz A., et al. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection // Applied and Environmental Microbiology. 1998. Vol. 64, no. 12. P. 4965–4972. DOI: 10.1128/AEM.64.12.4965-4972.1998.

25. Jain D., Sunda S.D., Sanadhya S., Nath D.J., Khandelwal S.K. Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains // 3 Biotech. 2017. Vol. 7, no. 1. P. 4. DOI: 10.1007/s13205-016-0583-7.

26. PCR primer design / ed. A. Yuryev. Totowa: Humana Press, 2007. 431 p.

27. Хайлафян А.А. Современные статистические методы медицинских исследований: монография. М.: Ленанд, 2014. 320 с.

28. Natingga D. Data science algorithms in a week. Birmingham – Mumbai: Packt Publishing, 2018. 214 p.

29. Galea A. Applied data science with Python and Jupyter. Birmingham – Mumbai: Packt Publishing, 2018. 174 p.

REFERENCES

1. Arthurs S., Dara S.K. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2019;165:13-21. DOI: 10.1016/j.jip.2018.01.008.

2. Jouzani G.S., Valijanian E., Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017;101:2691-2711. DOI: 10.1007/s00253-017-8175-y.

3. Duarte Neto J.M.W., Wanderley M.C.A., da Silva T.A.F., Marques D.A.V., da Silva G.R., Gurgel J.F., et al. *Bacillus thuringiensis* endotoxin production: a systematic review of the past 10 years. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020;36:128. DOI: 10.1007/s11274-020-02904-4.

4. Jo H., Tagele S.B., Pham H.Q., Kim M.-C., Choi S.-D., Kim M.-J., et al. Response of soil bacterial community and pepper plant growth to application of *Bacillus thuringiensis* KNU-07. *Agronomy*. 2020;10(4):551. DOI: 10.3390/agronomy10040551.

5. Perez M.P., Sauka D.H., Onco M.I., Berretta M.F., Benintende G.B. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Revista Argentina de Microbiología*. 2017;49(3):264-272. DOI: 10.1016/j.ram.2016.12.010.

6. Soleymani S., Sarrafzadeh M.-H., Mostoufi N. Modeling of fermentation process of *Bacillus thuringiensis* as a sporulating bacterium. *Chemical Product and Process Modeling*. 2019;14(2):2018000. DOI: 10.1515/cppm-2018-0007.

7. Guttman D.M., Ellar D.J. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. *FEMS Microbiology Letters*. 2000;188(1):7-13. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09160.x.

8. Hansen B.M., Hendriksen N.B. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. Vol. 67, no. 1. P.185–189. DOI: 10.1128/AEM.67.1.185-189.2001.

9. Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)*. 2014;6(12):3296-3325. DOI: 10.3390/toxins6123296.

10. Fang Y., Li Z., Liu J., Shu C., Wang X., Zhang X., et al. A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*.

Journal of Genetics and Genomics. 2011;38(12):567-576. DOI: 10.1016/j.jgg.2011.11.001.

11. Lee M.K., Walters F.S., Hart H., Palekar N., Chen J.-S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(8):4648-4657. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4648-4657.2003.

12. Sena J.A., Hernández-Rodríguez C.S., Ferré J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(7):2236-2237. DOI: 10.1128/AEM.02342-08.

13. Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S.S., Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;41(7):423-431. DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006.

14. Crickmore N., Zeigler D.R., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998;62(3):807-813. DOI: 10.1128/MMBR.62.3.807-813.1998.

15. Van Frankenhuyzen K. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2013;114(1):76-85. DOI: 10.1016/j.jip.2013.05.010.

16. Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins (Basel)*. 2014;6(4):1222-1243. DOI: 10.3390/toxins6041222.

17. De Maagd R.A., Bravo A., Berry C., Crickmore N., Schnepf H.E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*. 2003;37:409-433. DOI: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143042.

18. Chougule N.P., Bonning B.C. Toxins for transgenic resistance to hemipteran pests. *Toxins (Basel)*. 2012;4(6):405-429. DOI: 10.3390/toxins4060405.

19. Ohba M., Mizuki E., Uemori A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research*. 2009;29(1):427-433.

20. Zheng J., Gao Q., Liu L., Liu H., Wang Y., Peng D., et al. Comparative genomics of *Bacillus thuringiensis* reveals a path to specialized exploitation of multiple invertebrate hosts. *mBio*. 2017;8(4):e00822-17. DOI: 10.1128/mBio.00822-17.

21. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific

primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.

22. Franco-Rivera A., Benintende G., Cozzi J., Baizabal-Aguirre V.M., Valdez-Alarcón J.J., López-Meza J.E. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2004;86(1):87-92. DOI: 10.1023/B:ANTO.00000024913.94410.05.

23. Willumsen P.A., Johansen J.E., Karlson U. Isolation and taxonomic affiliation of N-heterocyclic aromatic hydrocarbon-transforming bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;67(3):420-428. DOI: 10.1007/s00253-004-1799-8.

24. Bravo A., Sarabia S., Lopez L., Ontiveros H., Abarca C., Ortiz A., et al. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied*

and Environmental Microbiology. 1998;64(12):4965-4972. DOI: 10.1128/AEM.64.12.4965-4972.1998.

25. Jain D., Sunda S.D., Sanadhya S., Nath D.J., Khandelwal S.K. Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *3 Biotech*. 2017;7(1):4. DOI: 10.1007/s13205-016-0583-7.

26. Yuryev A. *PCR primer design*. Totowa: Humana Press; 2007, 431 p.

27. Khalafyan A.A. *Modern statistical methods of medical research*. Moscow: Lenand; 2014, 320 p. (In Russian).

28. Natingga D. *Data science algorithms in a week*. Birmingham – Mumbai: Packt Publishing; 2018, 214 p.

29. Galea A. *Applied data science with Python and Jupyter*. Birmingham – Mumbai: Packt Publishing; 2018, 174 p.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Крыжко Анастасия Владимировна,
к.с.-х.н., ведущий научный сотрудник,
Научно-исследовательский институт
сельского хозяйства Крыма,
295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150,
Российская Федерация,
nk_lib@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5401-0579>

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 20.08.2024.
Одобрена после рецензирования 05.11.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Anastasiia V. Kryzhko,
Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher,
Research Institute of Agriculture of Crimea,
150, Kievskaya St., Simferopol, 295453,
Russian Federation,
nk_lib@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5401-0579>

Contribution of the author

The author performed the research, made a generalization on the basis of the results obtained and prepared the manuscript 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 20.08.2024.
Approved after reviewing 05.11.2024.
Accepted for publication 30.11.2024.



Влияние биостимулятора *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D на бактерии, выделенные из эндо- и ризосферы растений картофеля

А.С. Мориц, Ю.А. Маркова, Н.В. Филинова, И.С. Петрушин✉

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

Аннотация. Микробиом картофеля оказывает существенное влияние на рост и развитие растений. Для воздействия на микробиом в сельском хозяйстве перспективно использовать различные биопрепараты на основе почвенных микроорганизмов. Растения картофеля, будучи уязвимыми к патогенам и засухе, наиболее интересны в качестве объекта для разработки биопрепаратов. Особое внимание уделяется бактериям рода *Rhodococcus* благодаря их способности очищать почву от загрязнений и стимулировать рост растений. Целью проведенного исследования являлось изучение влияния штамма *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D на бактерии, выделенные из эндо- и ризосферы растений картофеля. Известно, что лишь малая часть микроорганизмов в составе растительного микробиома может быть получена в чистой культуре. С учетом этих ограничений без использования селективных сред удалось выделить более 70 эндофитных штаммов и показать, что многие из них чувствительны к присутствию компонента биопрепарата из *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D. Данные метагеномного исследования свидетельствуют об изменении состава микробного сообщества после обработки биопрепаратом. Эксперименты также показывают, что бактерии сохраняют чувствительность к родококку даже в присутствии других конкурирующих штаммов. В целом результаты проведенного исследования указывают на модулирующее воздействие биопрепарата на микробиом картофеля без фитотоксичности. Полученные сведения важны для понимания влияния биопрепаратов на микробный состав почвы и растений картофеля, а также для разработки эффективных стратегий использования микроорганизмов в сельском хозяйстве.

Ключевые слова: родококк, инокуляция, вторичные метаболиты, эндофиты, картофель

Благодарности. Биоинформатический анализ был выполнен на оборудовании Центра коллективного пользования «Биоинформатика» Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Секвенирование ДНК проведено в Центре коллективного пользования «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск).

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-26-10049.

Для цитирования: Мориц А.С., Маркова Ю.А., Филинова Н.В., Петрушин И.С. Влияние биостимулятора *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D на бактерии, выделенные из эндо- и ризосферы растений картофеля // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 578–585. DOI: 10.21285/achb.942. EDN: TIVSPZ.

Influence of *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D biostimulator on bacterial isolates from potato endo- and rhizosphere

Anna S. Morits, Yulia A. Markova, Nadezhda V. Filinova, Ivan S. Petrushin✉

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

Abstract. The potato microbiome has a significant impact on plant growth and development. In order to affect this microbiome, agriculture can use various biopreparations on the basis of soil microorganisms. Being vulnerable to pathogens and drought, potato plants are particularly useful in the development of biopreparations. Special attention is given to *Rhodococcus* bacteria due to their ability to clean contaminated soil and stimulate plant growth. The present study was aimed at examining the effect of *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D on bacteria isolated from potato endo- and rhizosphere. It is known that only a small fraction of microorganisms within the plant microbiome can be obtained in pure culture. Given these limitations, it was possible to isolate over 70 endophytic strains without the use of selective media and show that many of them are sensitive to the presence of a biopreparation component on the basis of *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D. The metagenomic study indicates a change in the composition of the microbial community following treatment with the biopreparation. The experiments also show that the bacteria remain sensitive to *Rhodococcus* even in the presence of other competing strains. In general, the study results indicate a modulating effect of the biopreparation on the potato microbiome without phytotoxicity. The findings are important for understanding the effect of the biopreparation on the microbial composition of soil and potato plants, as well as for developing effective strategies for the use of microorganisms in agriculture.

Keywords: *Rhodococcus*, inoculation, secondary metabolites, endophytes, potato

Acknowledgements. Bioinformational analysis was performed using the equipment of Research Equipment Sharing Center "Bioinformatika" of Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk). DNA sequence was carried out in Research Equipment Sharing Center "Genomika" of Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS (Novosibirsk).

Funding. Russian Science Foundation financially supported this work (grant no. 23-26-10049).

For citation: Morits A.S., Markova Yu.A., Filinova N.V., Petrushin I.S. Influence of *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D biostimulator on bacterial isolates from potato endo- and rhizosphere. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):578-585. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.942. EDN: TIVSPZ.

ВВЕДЕНИЕ

Микробиом картофеля, как и других высших растений, выполняет важные функции, поддерживая рост и развитие растения на всех этапах его жизни. Полезное действие микроорганизмов на растения заключается в увеличении азотфиксации, улучшении фосфорного питания, стимуляции роста, повышении устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды, подавлении фитопатогенов и т.д. [1]. В настоящее время большой интерес вызывает перспективность использования в сельском хозяйстве биопрепаратов на основе почвенных микроорганизмов, однако при их использовании необходимо учитывать не только их действие на растение, но и их влияние на состав автохтонной микрофлоры в разных нишах растения (ризосфере, эндосфере, филлосфере), в том числе в неблагоприятных условиях [2]. Растения картофеля, будучи уязвимыми к патогенам и засухе, особенно интересны в качестве объекта для разработки биопрепаратов. В литературе описаны успешные примеры

использования эндофитных и почвенных бактерий для обработки растений картофеля с целью повышения устойчивости к патогенам. В частности, устойчивость к фитофторе удалось повысить при обработке клубней бактериями *Bacillus subtilis* [3]. Известны также работы по изоляции штаммов микроорганизмов из микробиома диких сортов и видов культурных растений, устойчивых к определенным патогенам. Так, группе под руководством Н. Падилья-Гальвес удалось выявить антагонистическую активность штаммов бактерий рода *Streptomyces* по отношению к возбудителям болезней черной ножки (мягкой гнили) [4]. Эти бактерии были выделены из эндосферы дикого сорта картофеля, произрастающего в Чили.

Среди микроорганизмов, способных реагировать на неблагоприятные изменения в среде обитания и инициировать адаптивные реакции, особое место занимают актинобактерии рода *Rhodococcus*. За последнее десятилетие родококки вызвали значительный интерес благодаря своим высоким катаболическим свойствам. Эти

почвенные бактерии также являются известными продуцентами биологически активных соединений, в том числе обладающих антимикробным действием. Таким образом, родококки могут оказывать влияние на ассоциированные с растением микроорганизмы и играть роль в формировании почвенной экосистемы [5, 6].

Из ризосферы пырея ползучего (*Elymus repens*), произрастающего на нефтезагрязненной почве, нами в 2010 году был выделен штамм *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D. Было показано, что эти бактерии способны окислять как полициклические ароматические углеводороды, так и алканы, что позволяет использовать этот штамм для биологической очистки почв [7]. *R. qingshengii* VKM Ac-2784D входит в состав микробного препарата для биоремедиации почвы, загрязненной нефтью и нефтепродуктами. Установлено, что данный микроорганизм уменьшает неблагоприятное воздействие нефти на растения, а также обладает способностью стимулировать рост растений за счет присутствия в супернатантах ауксинов [8]. Как и некоторые известные штаммы родококка, выделенный нами штамм *R. qingshengii* VKM Ac-2784D способен синтезировать антимикробные соединения, что подтверждается наличием генных кластеров синтеза вторичных метаболитов [9]. В связи с этим возникает вопрос: как исследуемый штамм может повлиять на автохтонный микробиом ризо- и эндосферы растений картофеля при внесении его в почву в составе биопрепарата.

В литературе описаны подходы к анализу межмикробного взаимодействия, в том числе изолятов из эндосферы растений, для чего проводится массовый скрининг парного взаимодействия культур бактерий с последующим отбором случаев ингибирования или стимуляции [10]. Учитывая широкую доступность полногеномного секвенирования, данные такого скрининга возможно сопоставить с составом генных кластеров, участвующих в синтезе вторичных метаболитов [11].

Поскольку известно, что применение родококка может вызвать сдвиг в составе микробного сообщества растений [12], в рамках данной работы предпринята попытка оценить влияние *R. qingshengii* VKM Ac-2784D на бактерии, ассоциированные с растениями картофеля (*Solanum tuberosum*) сорта Луговской.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При проведении лабораторных исследований применяли штамм *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D из коллекции Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск). Штамм также передан нами во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов [13].

Для выделения эндо- и ризосферных бактерий использовали растения картофеля (*S. tuberosum*) сорта Луговской, выращиваемые на опытном участке, расположенном на территории бассейнов рек Малой Олхи и Большой Олхи на юго-западе Прибайкалья (52°02'07.9» N, 104°04'57.2» E). Выбор сорта картофеля обусловлен большим опытом работы с ним в рамках лаборатории растительно-микробных взаимодействий Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН и наличием культуры *in vitro* этого сорта [14].

Почвообразующими породами являлись элювиевые отложения коренных и подстилающих пород, почвы легкосуглинистые со слабой или средней

щебеночностью. Эндофитные бактерии выделяли из листьев картофеля, которые для этого промывали, обрабатывали 3%-й перекисью водорода в течение 5 мин, затем 96%-м этиловым спиртом 1 мин, далее трижды отмывали стерильной дистиллированной водой. Растительные образцы растирали в ступке, гомогенат последовательно разбавляли водой в соотношениях 1:1, 1:10 по объему. Ризосферные бактерии выделяли из почвенной вытяжки (1 г почвы на 10 мл дистиллированной воды). Использовали разведение от 10^{-1} до 10^{-11} . Посев эндо- и ризосферных бактерий осуществляли по 200 мкл на чашки Петри на твердый питательный агар на основе гидролизата говяжьего мяса ферментативного (ООО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии», Россия). Культивировали в термостате при температуре 26 °С.

Тинкториальные свойства эндо- и ризосферных бактерий определяли с использованием метода окраски по Граму.

Чувствительность бактерий к вторичным метаболитам *R. qingshengii* определяли дискодиффузионным методом. Для этого исследуемый штамм родококка культивировали в течение 3 суток ($OD = 0,2$ при длине волны 595 нм) в минеральной среде 8Е с концентрацией солей, г/л: $NH_4NO_3 - 1,0$, $MgCl_2 - 0,1$, $KH_2PO_4 - 3,0$, $K_2HPO_4 - 7,0$, $CaCO_3 - 1,0$; pH = 7,0. В качестве источника углерода к среде добавляли глюкозу (5 г/л). Для получения супернатанта суспензию клеток *R. qingshengii* центрифугировали 1–2 мин при 14000 об/мин (CM-150 Micro, Stegler, Китай).

В чашку Петри вносили по 200 мкл бактериальной суспензии (бактерии, ассоциированные с картофелем). На поверхность агара помещали диски из фильтровальной бумаги (диаметром 8 мм) и аккуратно пропитывали их супернатантом (10 мкл). Культивировали в термостате при температуре 26 °С. Через 2 суток фиксировали размер зоны подавления роста вокруг диска в миллиметрах.

Для моделирования взаимоотношений родококка с чувствительным к нему изолятом (№ 38) и картофелем *in vitro* растения выращивали в течение 10 суток на твердой питательной среде Мурасиге – Скуга (MS) (Sigma, США) с добавлением 20 г/л сахарозы при температуре 20–21 °С с 16-часовым фотопериодом до достижения ими размера $4,2 \pm 0,1$ см. Далее переносили на жидкую среду MS для адаптации на 4 дня. Затем в среду роста добавляли смыв (200 мкл) изолята № 38 с твердого агарового субстрата ($OD = 0,2$ при длине волны 595 нм). Длительность коинкубации составляла 10 суток. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий в начале экспозиции составляло $\log 7$ кл/мл. Высев бактерий из эндо- и ризосферы картофеля осуществляли каждые 48 ч. Для изоляции эндосферных бактерий верхнюю часть растения (2 см) растирали в ступке с добавлением 90 мкл среды, далее 10 мкл гомогената разводили в соотношениях 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000. На чашку Петри вносили по 90 мкл суспензии. Для оценки ризосферы брали по 10 мкл среды роста растений, разведение и высеив проводили аналогично вышеописанному. Подсчет колоний производили через 2 суток.

Для оценки влияния среды роста MS растений на *R. qingshengii* и эндосферную бактерию № 38, ассоции-

рованную с *S. tuberosum*, обе бактерии культивировали в течение 10 суток в данной среде. Смыв бактерий производили с твердой агаризованной среды ($OD = 0,2$ при длине волны 595 нм), инкубировали в тех же условиях, что и растения картофеля *in vitro*. Через каждые 48 ч производили высев культур на чашки для подсчета КОЕ.

Для поиска генов, кодирующих вторичные метаболиты, проводили анализ генома *R. qingshengii* VKM Ac-2784D [9] в программе AntiSMASH версии 7.1.0 [15].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Создание коллекции эндо- и ризосферных бактерий растений картофеля сорта Луговской. Из образцов ризосферы и эндосферы картофеля сорта Луговской были выделены 74 бактериальные культуры, из них 4 грамотрицательных, 70 грамположительных. 39 штаммов обладали способностью к спорообразованию. Все культуры были использованы в дальнейших экспериментах для оценки антагонизма с *R. qingshengii* VKM Ac-2784D.

Антагонизм *Rhodococcus qingshengii* по отношению к бактериям, ассоциированным с растениями картофеля сорта Луговской. Установлено, что из всех выделенных бактерий наиболее высокой чувствительностью обладали 5 штаммов (7% от всех изолятов) с диаметром зоны подавления роста 18–22 мм, 17 штаммов (23%) обладали средней восприимчивостью (диаметр подавления роста – 14–18 мм), а 24 штамма (32%) показали слабую чувствительность. Остальные 28 изолятов проявляли устойчивость к метаболитам *R. qingshengii*. Одним из наиболее чувствительных штаммов являлся грамположительный спорообразующий изолят № 38 (рис. 1).

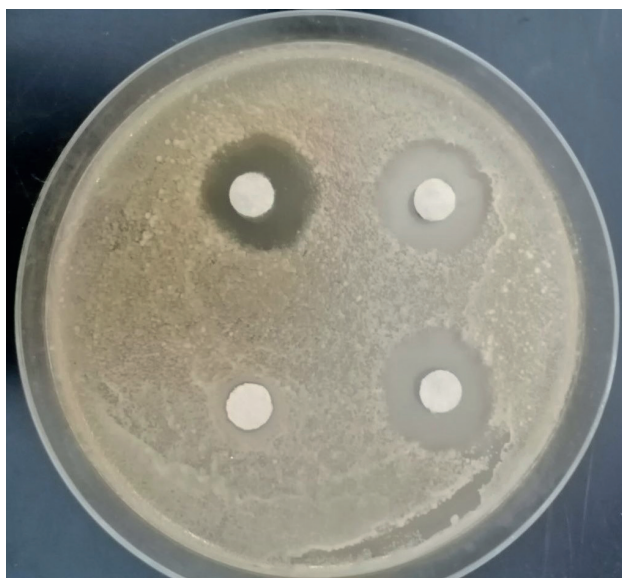


Рис. 1. Оценка влияния метаболитов *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D на изолят № 38 (К – контроль (стерильная дистиллированная вода); С – супернатант *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D)

Fig. 1. Evaluation of *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D metabolites impact on isolate no. 38 (K – control (sterile water); C – supernatant of *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D)

Моделирование взаимоотношений *Rhodococcus qingshengii* со штаммом № 38 в растении картофеля *in vitro*. При инкубировании *R. qingshengii* VKM Ac-2784D и наиболее чувствительного к нему изолята № 38 в среде роста растений картофеля MS было показано, что обе культуры способны к выживанию в данной среде как в случае монокультуры, так и при совместном культивировании (рис. 2).

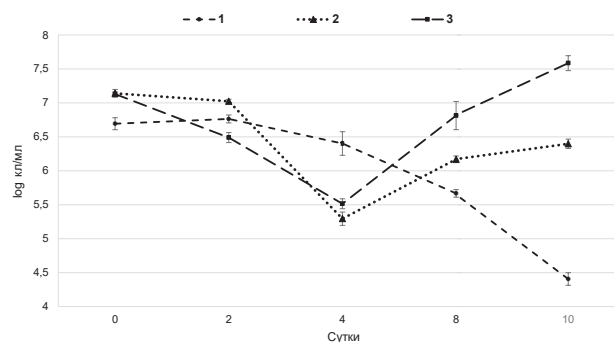


Рис. 2. Изменение количества колониеобразующих единиц культур *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D и изолята № 38 в среде Мурасиге – Скуга:

1 – *Rhodococcus qingshengii*; 2 – изолят № 38; 3 – совместное культивирование *Rhodococcus qingshengii* и изолята № 38

Fig. 2. Change of the number of colony-forming units of *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D and isolate no. 38 at the Murashige and Skoog culture:

1 – *Rhodococcus qingshengii*; 2 – isolate no. 38; 3 – both *Rhodococcus qingshengii* and isolate no. 38

При заражении растений картофеля *in vitro* сорта Луговской *R. qingshengii* VKM Ac-2784D и изолятом № 38 показано, что данные микроорганизмы не обладают фитотоксическим действием на растения и практически не оказывают влияния на рост растений (рис. 3).

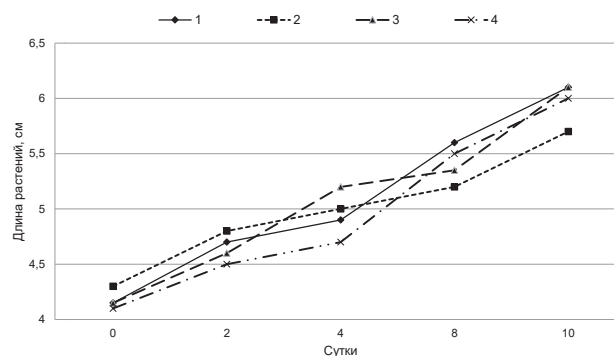


Рис. 3. Рост растений картофеля *in vitro* при коинокуляции *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D и изолятом № 38:

1 – контроль; 2 – изолят № 38; 3 – *Rhodococcus qingshengii*; 4 – совместное культивирование *Rhodococcus qingshengii* и изолята № 38

Fig. 3. Potato plant growth *in vitro* when co-inoculated with *Rhodococcus qingshengii* and isolate no. 38: 1 – control; 2 – isolate no. 38; 3 – *Rhodococcus qingshengii*; 4 – both *Rhodococcus qingshengii* and isolate no. 38

Исследуемые бактерии проникали в эндосферу картофеля *in vitro*. Дальнейшее высевание колоний бактерий из тканей картофеля, зараженных ими, и подсчет количества КОЕ штамма № 38 и родококка в эндосфере картофеля показало, что эти бактерии способны к эндофитному образу жизни.

При совместном культивировании, начиная с 4-х суток, родококк оказывал угнетающее воздействие на изолят № 38, которое продолжалось до 9-х суток, как в среде роста, так и в эндосфере (рис. 4, 5).

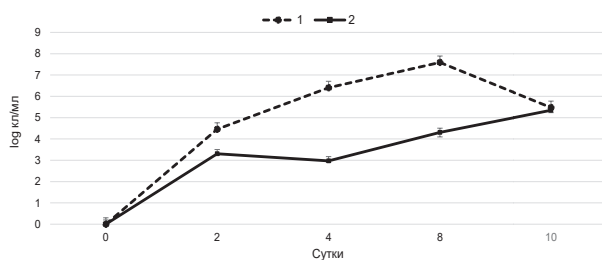


Рис 4. Изменение количества колониеобразующих единиц *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D и изолята № 38 в эндосфере растений картофеля *in vitro*: 1 – изолят № 38; 2 – *Rhodococcus qingshengii*

Fig. 4. Change of the number of colony-forming units of *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D and isolate no. 38 at the endosphere of potato plant *in vitro*: 1 – isolate no. 38; 2 – *Rhodococcus qingshengii*

На 10-е сутки количество КОЕ было примерно равным, что говорит о компенсационном влиянии растения и установлении равновесия в системе «растение – изолят № 38 – родококк».

Определение генных кластеров, кодирующих вторичные метаболиты в геноме *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D. Чтобы выяснить состав антимикробных соединений, синтезируемых родококком, был проведен анализ генных кластеров полного генома родококка [13] с помощью инструмента AntiSmash версии 7.1.0 [15]. Анализ указывает на наличие в геноме *R. qingshengii* VKM Ac-2784D 8 генных кластеров, кодирующих нерибосомальные пептидсинтетазы, характерные для родококков [16], в том числе гетеробактин (100%-я гомология) и эритрохелин (57%-я гомология). Перечень обнаруженных кластеров с указанием доли сходства с экспе-

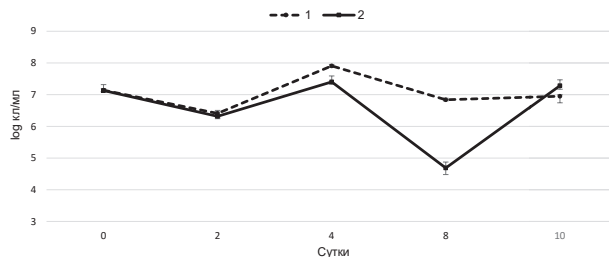


Рис. 5. Изменение количества колониеобразующих единиц *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D и изолята № 38 в среде роста растений картофеля *in vitro*: 1 – изолят № 38; 2 – *Rhodococcus qingshengii*

Fig. 5. Change of the number of colony-forming units of *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D and isolate no. 38 at the growth media of potato plant *in vitro*: 1 – isolate no. 38; 2 – *Rhodococcus qingshengii*

риментально подтвержденными образцами приведен в таблице. Присутствие генов синтеза эктоина указывает на способность бактерий к осморегуляции (характерно для представителей *Rhodococcus*), что позволяет им адаптироваться к широкому спектру внешних условий при осмотическом стрессе [17]. Синтез эктоина часто сочетается с синтезом трегалозы, соответствующие гены также содержатся в геноме *R. qingshengii* VKM Ac-2784D, что описано в одной из наших предыдущих публикаций [9]. Выработка ароматического каротиноида изорениератена позволяет бактерии нейтрализовать активные формы кислорода, повышает фотозащитные свойства и антиоксидантную активность [18], в том числе благодаря его более устойчивой к ультрафиолету форме в сравнении с другими каратеноидами [19].

Для борьбы с конкурирующими бактериями штамм обладает необходимыми средствами. Так, тетрапептидные сидерофоры гидроксаматного типа (эритрохелин и коэлихелин) за счет ингибирующего действия против *Bacillus*, *Micrococcus* spp. и *Pseudomonas* позволяют получить преимущество в условиях дефицита железа [20]. Аналогичную функцию выполняет гетеробактин, катехолатно-гидроксаматный сидерофор смешанного типа. Рассматриваемый штамм способен синтезировать и антибиотики, такие как ϵ -поли-лизин, представляющий собой нетоксичный и биоразлагаемый гомополи-

Описание генных кластеров синтеза вторичных метаболитов, обнаруженных в геноме *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D

Secondary metabolites gene clusters description of *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D genome

Тип кластера	Наименование	Процент идентичности	Идентификатор в базе NCBI ¹
RiPP-like	branched-chain fatty acids	75	MG324007
ectoine	ectoine	75	MT149902
terpene	isorenieratene	42	AP009493
NRPS	coelichelin	27	AL645882
NRP-metallophore	heterobactin B	100	LQWU01000088
NRP-metallophore	erythrochelin	57	AM420293
NRPS-like	corynecine III	100	CP023720
NAPAA	ϵ -poly-L-lysine	100	LC517046

¹ National Center for Biotechnology Information // Ncbi.nlm.nih.gov. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 21.03.2024).

пептид из микроорганизмов родов *Streptomyces* и *Kitasatospora* [21].

Широкое применение различных бактерий для инокуляции растений картофеля, несмотря на успешность многих экспериментов [1], оставляет открытыми несколько существенных вопросов. Во-первых, важно понимать, как долго могут сохраняться внесенные в почву компоненты биопрепарата, требуется ли повторная обработка в течение полевого сезона до сбора урожая. Во-вторых, выяснить, индуцирует ли биопрепарат существенное изменение состава микробиома почвы и растения, возможно негативного свойства (аналогично дисбиозу у животных после приема антибиотиков или обширной инфекции). Некоторые исследователи отмечают, что инокуляция биопрепаратом может вызвать сдвиг в составе микробного сообщества растений [12]. В этом случае необходимо определить, сохраняются ли после инокуляции родококком в составе микробиома растения ключевые представители микробного сообщества.

Первым шагом к оценке влияния родококка на микробиом картофеля стали метагеномные исследования, проводимые нами в рамках проекта Российского научного фонда (№ 23-26-10049). В образцах ризосферной почвы картофеля преобладали представители филумов *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Firmicutes*. Предварительные данные таксономического анализа указывают на то, что обработка суспензией клеток родококка привела к снижению содержания *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*. Напротив, содержание *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* возросло. Тем не менее говорить о том, как такой сдвиг состава микробного сообщества влияет на физиологию растения и его продуктивность, без физиологического исследования с достаточным количеством статистически убедительных данных затруднительно.

Особый интерес представляют механизмы конкуренции, аспекты антагонизма разных штаммов [22].

Известно, что лишь малая часть микроорганизмов в составе растительного микробиома может быть получена в чистой культуре и зачастую требуется подбор среды и особых условий [23]. Даже с учетом этих ограничений без использования селективных сред нам удалось выделить более 70 эндофитных штаммов и показать, что многие из них чувствительны к присутствию компонента биопрепарата *R. qingshengii* VKM Ac-2784D. Выделенные штаммы были сгруппированы по чувствительности к родококку от высокой (7% изолятов) и средней (23% изолятов) к минимальной (32% изолятов) и нулевой, т.е. резистентности (28% изолятов). Определив в дальнейшем в общем микробиоме долю чувствительных штаммов, можно грубо оценить изменение их относительной представленности после обработки биопрепаратом. Из группы высокочувствительных штаммов для исследования антагонизма был выбран изолят № 38. Заражение растений картофеля *in vitro* родококком и изолятом № 38 не выявило фитотоксического эффекта – достоверного изменения роста растений не происходило. Дальнейшая совместная культивация этих бактерий (родококка и изолята № 38) в составе растения показала, что изолят № 38 сохраняет чувствительность к родококку даже в таких условиях. Для борьбы с конкурирующими бактериями штамм обладает необходимыми средствами: синтезирует антиоксидантные, антимикробные соединения и сидерофоры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показывают, что биопрепарат *R. qingshengii* VKM Ac-2784D способен оказывать модулирующее действие на компоненты микробиома картофеля, фитотоксичной активности по отношению к картофелю не выявлено. Представители основных бактериальных таксонов сохраняются в микробиоме, хотя их доля меняется по сравнению с контрольными образцами.

REFERENCES

1. Petrushin I.S., Filinova N. V., Gutnik D.I. Potato microbiome: relationship with environmental factors and approaches for microbiome modulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(2):750. DOI: 10.3390/ijms25020750.
2. Petrushin I.S., Vasilev I.A., Markova Yu.A. Drought tolerance of legumes: physiology and the role of the microbiome. *Current Issues in Molecular Biology*. 2023;45(8):6311-6324. DOI: 10.3390/cimb45080398.
3. Yarulina L.G., Burkhanova G.F., Tsvetkov V.O., Cherepanova E.A., Zaikina E.A., Sorokan A.V., et al. Stimulation of the protective mechanisms of *Solanum tuberosum* by the bacteria *Bacillus subtilis* and chitoooligosaccharides upon infection with *Phytophthora infestans*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2022;58:166-174. DOI: 10.1134/S0003683822020168.
4. Padilla-Gálvez N., Luengo-Urbe P., Mancilla S., Maurin A., Torres C., Ruiz P., et al. Antagonistic activity of endophytic actinobacteria from native potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* L.) against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*. *BMC Microbiology*. 2021;21:335. DOI: 10.1186/s12866-021-02393-x.
5. Cappelletti M., Presentato A., Piacenza E., Firrincieli A., Turner R.J., Zannoni D. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020;104:8567-8594. DOI: 10.1007/s00253-020-10861-z.
6. Ivshina I., Bazhutina G., Tyumina E. *Rhodococcus* strains as a good biotool for neutralizing pharmaceutical pollutants and obtaining therapeutically valuable products: through the past into the future. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:967127. DOI: 10.3389/fmicb.2022.967127.
7. Krivoruchko A., Kuyukina M., Peshkur T., Cunningham C.J., Ivshina I. *Rhodococcus* strains from the specialized collection of alkanotrophs for biodegradation of aromatic compounds. *Molecules*. 2023;28(5):2393. DOI: 10.3390/molecules28052393.
8. Tretyakova M.S., Ivanova M.V., Belovezhets L.A., Markova Yu.A. Possible use of oil-degrading microorganisms for protection of plants growing under conditions of oil pollution. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019;315:072046. DOI: 10.1088/1755-1315/315/7/072046.
9. Markova Yu.A., Petrushin I.S., Belovezhets L.A. Detection of gene clusters for biodegradation of alkanes and aromatic compounds in the *Rhodococcus qingshengii*

VKM Ac-2784D genome. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(3):276-282. DOI: 10.18699/VJGB-23-33.

10. Helfrich E.J.N., Vogel C.M., Ueoka R., Schäfer M., Ryffe F., Müller D.B., et al. Bipartite interactions, antibiotic production and biosynthetic potential of the *Arabidopsis* leaf microbiome. *Nature Microbiology*. 2018;3:909-919. DOI: 10.1038/s41564-018-0200-0.

11. Scherlach K., Hertweck C. Mining and unearthing hidden biosynthetic potential. *Nature Communications*. 2021;12:3864. DOI: 10.1038/s41467-021-24133-5.

12. Chen W., Zuo Y., Hou Z., Wang B., Xiong S., Ding X., et al. Effect of *Rhodococcus* bioaugmentation and biostimulation on dibenzothiophene biodegradation and bacterial community interaction in petroleum-contaminated soils. *Frontiers in Environmental Science*. 2023;11:1270599. DOI: 10.3389/fenvs.2023.1270599.

13. Petrushin I.S., Markova Y.A., Karepova M.S., Zaytseva Y.V., Belovezhets L.A. Complete genome sequence of *Rhodococcus qingshengii* strain VKM Ac-2784D, isolated from *Elytrogia repens* rhizosphere. *Microbiology Resource Announcements*. 2021;10(11). DOI: 10.1128/mra.00107-21.

14. Graskova I.A., Romanenko A.S., Vladimirova S.V., Kolesnichenko A.V. Changes in peroxidase activity during potato ring rot infection. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2004;51:476-479. DOI: 10.1023/B:RUPP.0000035739.81684.11.

15. Blin K., Shaw S., Augustijn H.E., Reitz Z.L., Biermann F., Alanjary M., et al. AntiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Research*. 2023;51(W1):W46-W50. DOI: 10.1093/nar/gkad344.

16. Undabarrena A., Valencia R., Cumsille A., Zamora-Leiva L., Castro-Nallar E., Barona-Gomez F., et al. *Rhodococcus* comparative genomics reveals a phylogenomic-dependent non-ribosomal peptide synthetase distribution: insights into biosynthetic gene cluster connection to an orphan metabolite. *Microbial Genomics*. 2021;7(7):000621. DOI: 10.1099/mgen.0.000621.

17. Czech L., Hermann L., Stöveken N., Richter A.A., Höppner A., Smits S.H.J., et al. Role of the extremolytes ectoine and hydroxyectoine as stress protectants and nutrients: genetics, phylogenomics, biochemistry, and structural analysis. *Genes*. 2018;9(4):177. DOI: 10.3390/genes9040177.

18. Chen Y., Xie B., Yang J., Chen J., Sun Z. Identification of microbial carotenoids and isoprenoid quinones from *Rhodococcus* sp. B7740 and its stability in the presence of iron in model gastric conditions. *Food Chemistry*. 2018;240:204-211. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.067.

19. Jiang W., Sun J., Gao H., Tang Y., Wang C., Jiang Y., et al. Carotenoids production and genome analysis of a novel carotenoid producing *Rhodococcus aetherivorans* N1. *Enzyme and Microbial Technology*. 2023;164:110190. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2022.110190.

20. O'Brien S., Culbert C.T., Barraclough T.G. Community composition drives siderophore dynamics in multispecies bacterial communities. *BMC Ecology and Evolution*. 2023;23:45. DOI: 10.1186/s12862-023-02152-8.

21. Nazari M.T., Simon V., Machado B.S., Crestani L., Marchezi G., Concolato G., et al. *Rhodococcus*: a promising genus of actinomycetes for the bioremediation of organic and inorganic contaminants. *Journal of Environmental Management*. 2022;323:116220. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.116220.

22. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Tyumina E.A. Responses to ecopollutants and pathogenization risks of saprotrophic *Rhodococcus* species. *Pathogens*. 2021;10(8):974. DOI: 10.3390/pathogens10080974.

23. Sarhan M.S., Patz S., Hamza M.A., Youssef H.H., Mourad E.F., Fayed M., et al. G3 phylochip analysis confirms the promise of plant-based culture media for unlocking the composition and diversity of the maize root microbiome and for recovering unculturable candidate divisions/phyla. *Microbes and Environments*. 2018;33(3):317-325. DOI: 10.1264/jsme2.ME18023.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Мориц Анна Сергеевна,

ведущий инженер,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
aconitkaaco@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2266-3764>

Маркова Юлия Александровна,

д.б.н., главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
juliam06@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7767-4204>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anna S. Morits,

Leading Engineer,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
aconitkaaco@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2266-3764>

Yuliya A. Markova,

Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher,
Head of the Laboratory,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
juliam06@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7767-4204>

Филинова Надежда Владимировна,
к.б.н., ведущий технолог,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
filinova_nv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0328-6716>

Петрушин Иван Сергеевич,
к.т.н., научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ ivan.kiel@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8788-5352>

Вклад авторов

А.С. Мориц – проведение экспериментов,
подготовка иллюстративного материала.
Ю.А. Маркова – разработка концепции
исследования, развитие методологии,
обсуждение результатов, написание
текста статьи.
Н.В. Филинова – обсуждение результатов,
написание текста статьи.
И.С. Петрушин – обработка полученных
данных, обсуждение результатов,
написание текста статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

*Поступила в редакцию 04.08.2024.
Одобрена после рецензирования 20.09.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.*

Nadezhda V. Filinova,
Cand. Sci. (Biology), Leading Technologist,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
filinova_nv@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0328-6716>

Ivan S. Petrushin,
Cand. Sci. (Engineering), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ ivan.kiel@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8788-5352>

Contribution of the authors

Anna S. Morits – investigation, visualization.
Yulia A. Markova – conceptualization,
methodology, results discussion, writing
the text of manuscript.
Nadezhda V. Filinova – results discussion,
writing the text of manuscript.
Ivan S. Petrushin – data processing,
results discussion, writing the text of 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 04.08.2024.
Approved after reviewing 20.09.2024.
Accepted for publication 30.11.2024.*

Научная статья
УДК 664.951+573.6
EDN: ZTSNWI
DOI: 10.21285/achb.949



Влияние метода су-вид и ферментативной реструктуризации мышечной ткани макруруса малоглазого на формирование качества готовой продукции

Т.Н. Пивненко✉, Ю.М. Позднякова, Е.М. Панчишина, Р.В. Есипенко

Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,
Владивосток, Российская Федерация

Аннотация. Цель проведенного исследования заключалась в обосновании технологии переработки глубоководного объекта промысла Тихоокеанского бассейна – макруруса малоглазого – на основе метода су-вид и ферментативной реструктуризации мышечной ткани. Были определены физико-химические свойства мышечной ткани на различных стадиях обработки, изменения фракционного состава белков, проведено сравнение предлагаемой технологии и традиционных способов термообработки; определены рациональные параметры процесса, изучена стабильность готовой продукции при хранении и показатели ее безопасности. Показатели качества при обработке различными способами (варка в воде, обработка паром и су-вид) отразили снижение плотности, разрушение структуры мышечной ткани и утрату потребительской привлекательности готового продукта во всех случаях. При обработке методом су-вид технологические потери были существенно меньшими, что соответствовало меньшей степени денатурации белка. Для достижения необходимых показателей качества была проведена предварительная реструктуризация мышечной ткани макруруса с использованием трансклутаминазы для формирования сшивок между молекулами белка. Дополнительными субстратами, усиливающими полимеризацию эндогенных белков, служили желатин и лактат хитозана. Продукты сохраняли целостность структуры при повышении ее прочности. Рассмотрено влияние трансклутаминазы на связывание саркоплазматических и миофибриллярных белков с образованием высокомолекулярных конъюгатов. При морозильном хранении образцов в течение 6 месяцев существенных изменений физико-химических показателей, включая степень денатурации белка и прочность готового продукта, не отмечено. За период хранения для всех образцов микробная контаминация не превышала 10^2 КОЕ/г. Добавление лактата хитозана значительно снизило рост психрофильных микроорганизмов.

Ключевые слова: су-вид, трансклутаминаза, желатин, хитозан, макрурус малоглазый

Для цитирования: Пивненко Т.Н., Позднякова Ю.М., Панчишина Е.М., Есипенко Р.В. Влияние метода су-вид и ферментативной реструктуризации мышечной ткани макруруса малоглазого на формирование качества готовой продукции // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 586–595. DOI: 10.21285/achb.949. EDN: ZTSNWI.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Effect of the sous-vide method and enzymatic rearrangement of giant grenadier muscle tissue on the quality of finished products

Tatyana N. Pivnenko✉, Julia M. Pozdnyakova,
Ekaterina M. Panchishina, Roman V. Esipenko

Far Eastern State Technical Fisheries University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. The conducted study was aimed at validating a technology for processing a deep-sea fishing species of the Pacific Basin (giant grenadier) using the sous-vide method and enzymatic rearrangement of muscle tissue. The

physicochemical properties of muscle tissue at different processing stages were determined, as well as changes in protein fractions; the proposed technology and conventional heat treatment methods were compared; rational process parameters were established; the stability of finished products during storage and their safety characteristics were analyzed. With the use of different processing methods (cooking in water, steam treatment, and sous-vide), the quality indicators reflect a decrease in density, destruction of the muscle tissue structure, and loss of consumer appeal of finished products in all cases. For the sous-vide method, the process losses were significantly lower, which corresponded to a lower degree of protein denaturation. In order to achieve the required quality indicators, giant grenadier muscle tissue was preliminarily rearranged using transglutaminase to form cross-links between protein molecules. Gelatin and chitosan lactate served as additional substrates, enhancing the polymerization of endogenous proteins. The products maintained their structural integrity with an increase in strength. The paper examines the effect of transglutaminase on the binding of sarcoplasmic and myofibrillar proteins with the formation of macromolecular conjugates. With six-month freezer storage of samples, no significant changes in the physicochemical parameters were observed, including the degree of protein denaturation and the strength of finished products. During storage, microbial contamination did not exceed 10^2 CFU/g for all samples. The addition of chitosan lactate significantly reduced the growth of psychrophilic microorganisms.

Keywords: sous-vide, transglutaminase, gelatin, chitosan, giant grenadier

For citation: Pivnenko T.N., Pozdnyakova J.M., Panchishina E.M., Esipenko R.V. Effect of the sous-vide method and enzymatic rearrangement of giant grenadier muscle tissue on the quality of finished products. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):586-595. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.949. EDN: ZTSNW1.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время значительно возрос интерес к продуктам, прошедшим минимально допустимую тепловую обработку, в процессе которой сохраняются нативные свойства исходных питательных компонентов. В наибольшей степени это относится к миофибрилярным белкам мышечной ткани, определяющим пищевую ценность и органолептические свойства мясных и рыбных продуктов. Максимальное сохранение исходной структуры и свойств соответствует требованиям современных потребителей, стремящихся к здоровому образу жизни и питания. Одновременно технологии щадящей/мягкой обработки выгодны и для предприятий пищевой промышленности, так как предлагаемое современное оборудование, достаточно легкое в эксплуатации, обеспечивает быстроту приготовления при соблюдении высокой степени гигиены. К щадящим методам обработки пищевых продуктов относят су-вид (от фр. *sous-vide* – «под вакуумом»); омический нагрев, радиочастотный нагрев, КЭЧ-технологии; LN-LN-технологии и другие [1–3]. Наибольшее распространение приобретает технология су-вид, при которой желаемая степень готовности достигается путем приготовления продуктов при контролируемых условиях температуры и времени в термостойких вакуумированных пакетах без непосредственного контакта с теплоносителем, перегрева и обводнения [1, 3]. Вакуумная герметизация обеспечивает эффективную передачу тепла от воды/пара к продуктам, исключает риск повторного загрязнения при хранении, препятствует окислению, сохраняет летучие вкусообразующие компоненты, уменьшает рост аэробных бактерий [4–6]. Данная технология первоначально была предложена и апробирована на мясном сырье, по использованию ее в рыбопереработке имеются лишь начальные исследования для отдельных видов рыб [7, 8].

Сенсорные свойства рыбных продуктов определяются физико-химическими изменениями мышечной ткани рыб, основными компонентами которой являются миофибрилярные белки. В связи с этим преобразования, происходящие с белками, являются важными аспектами исследований для обоснования новых

технологий. Использованный в предлагаемой работе макрурус малоглазый *Albatrossia pectoralis* принадлежит к семейству глубоководных рыб Macrouridae, родственных тресковым Gadidae. Большие промысловые запасы и развитие глубоководного промысла обеспечивают возможности для его массового вылова и потребления. Данный вид рыб характеризуется хорошими вкусовыми качествами, полноценным составом аминокислот и низким содержанием липидов. В то же время высокая степень обводненности мышечной ткани (более 90%) определяет сложность его обработки, приводит к большим технологическим потерям и необходимости поиска приемлемых товарных форм готовой продукции [9]. Важно определить необходимые и достаточные режимы тепловой обработки макруруса малоглазого. С этой точки зрения технология су-вид способна обеспечить минимальное воздействие на весьма лабильные белки мышечной ткани малоглазого долгохвоста, как еще называют макруруса. Су-вид можно комбинировать с другими технологиями, в том числе могут быть использованы приемы, ранее предложенные нами, а именно реструктуризация под действием ферментного препарата трансглутаминазы, что обеспечивает сополимеризацию миозина и дополнительно вводимых пищевых субстратов [10]. Полученные результаты позволят увеличить объемы переработки и потребления этого сложного в технологическом плане объекта, а также выявить биохимические механизмы протекающих процессов.

Целью данного исследования явилось обоснование комбинированной технологии обработки мышечной ткани макруруса малоглазого, включающей низкотемпературную вакуумную обработку и ферментативную реструктуризацию, изучение изменений мышечных белков на различных стадиях обработки, а также исследование безопасности полученных продуктов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследований служил глубоководный вид рыб макрурус малоглазый *Albatrossia pectoralis* (далее макрурус). Для исследования брали замороженные образцы сроком хранения 6–8 месяцев. Для ферментативной реструктуризации применяли препарат ACTIVA®

TG-TI (Ajinomoto Co., Inc., Япония). В качестве дополнительных субстратов использовали пищевой желатин (ГОСТ 11293-89¹) и лактат хитозана, приготовленный в лабораторных условиях. Для приготовления лактата хитозана навеску высокомолекулярного хитозана («ФармОушенЛаб», Россия) растворяли в 0,3%-й уксусной кислоте при соотношении 1:100 (масса/объем). К полученному раствору добавляли 10%-й NaOH при объемном соотношении 1:50. Образовавшийся осадок отмывали дистиллированной водой. К переосажденному хитозану добавляли дистиллированную воду. Затем вводили 5%-ую молочную кислоту при постоянном перемешивании, доводя pH раствора до 5,5. При таком значении pH хитозан переходит в поликатионную форму лактата и растворяется в воде.

Предварительная обработка рыбы включала размораживание, удаление чешуи, разделку на филе с кожей, мойку, стекание, порционирование. Для установочных экспериментов были приготовлены образцы филе размером примерно 5×5 см и массой около 50 г. Для ферментативной обработки использовали фарш.

Для вакуумной упаковки использовали армированные трехслойные рулоны для су-вид марки Caso плотностью 115 мкр. Термическую обработку проводили на водяной бане.

Степень денатурационных изменений белков при термической обработке соответствует изменению способности миофибриллярных белков растворяться в стандартных солевых растворах. Количественное выражение степени денатурации (в процентах) рассчитывали по отношению разницы массовой доли белков до и после термической обработки к ее исходной величине. Изменения массы образцов (также в процентах) при тепловой обработке определяли как соотношение массы образца до и после обработки.

Для определения реологических показателей использовали текстурометр Брукфильда TextureProCTV 1.8 сборка 31, зонд TA 18. Измеряли следующие показатели: прочность, Н; твердость, г; пластическую деформацию, мм; упругую деформацию, мм; восстановимый рабочий цикл, mJ; адгезионную способность, mJ; коэффициент упругости.

Органолептическую оценку качества готовой продукции проводили с использованием количественного описательного анализа с применением балльной шкалы [9].

Электрофорез проводили в 10%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, напряжение 220 В, ток 10 мА, мощность 2,5 Вт, температура 15 °С. Окрашивали пластинки 0,01%-м раствором Кумасси G-250. Для экстракции 0,5 г измельченной мышечной ткани заливали 2 мл 2%-го раствора додецилсульфата натрия, через 30 мин центрифугировали 15 мин при 12000 об/мин, отбирали 0,25 мл раствора, добавляли 1,5 мл 0,5 М Трис-HCl буфера (pH 6,8), нагревали при 95 °С и фильтровали. Молекулярную массу белков определяли по калибровочному графику, построенному в координатах зависимости R_f от молекулярной массы по значениям, соответствующим маркерным белкам:

8, 12, 20, 30, 45, 60, 100, 220 кДа (наборы Sigma-Aldrich, США). Денситограммы снимали при помощи программы Image J для Windows (Wayne Rasband).

Оценку микробиологических показателей: количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, а также микроорганизмов порчи (дрожжи и плесневые грибы) определяли согласно ТР ЕАЭС 040/2016².

Для выделения психрофильных микроорганизмов к навеске измельченного образца добавляли физраствор в соотношении 1:9. Далее готовили ряд последовательных 10-кратных разведений. Разведения переносили в чашки Петри, заливали рыбопитательным агаром, инкубировали при температуре 5, 20 и 36 °С в течение 10 дней. Подсчет колоний проводили в тех чашках, в которых выросло от 30 до 300 колоний. Количество микроорганизмов в 1 г продукта вычисляли путем умножения среднеарифметического числа колоний на разведение навески и делением на количество посевного материала, внесенного в чашку.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для начальных экспериментов использовали филе макруруса размером около 5×5 см с массой 50 г. Образцы помещали в пакеты, вакуумировали и выдерживали при заданном режиме. Температура обработки составила 60 °С, продолжительность обработки – 30 мин. Выбор данных показателей был обоснован результатами проведенных ранее исследований [11]. Образцы для варки в воде и обработки паром подготавливали аналогичным образом до стадии термообработки. Варку в воде проводили при 96±2,0 °С в течение 10–12 мин, обработку насыщенным водяным паром – при 98±2,0 °С в течение 10–12 мин. По завершении термообработки пакеты с рыбой охлаждали, проводили запланированные исследования или замораживали для дальнейшего хранения.

Отличия сенсорных характеристик для образцов филе макруруса не были выражены при различных способах обработки: варке в воде, обработке при помощи пара и технологии су-вид. Во всех случаях наблюдали значительное отделение воды, снижение плотности, разрушение структуры и утрату потребительской привлекательности готового продукта. Снижение времени обработки при помощи технологии су-вид от 30 до 10 мин не дало существенных отличий в реологических и сенсорных показателях. Однако технологические потери при использовании метода су-вид были меньшими, чем при других видах обработки (рис. 1). В связи с этим для дальнейших исследований была выбрана продолжительность обработки при помощи технологии су-вид 10 мин.

В этих условиях миофибриллярные белки мышечной ткани макруруса менее всего подвержены термоденатурации, поэтому сохраняют способность к связыванию большего количества воды (рис. 2).

В этих же условиях при обработке методом су-вид реологические показатели образцов практически не

¹ ГОСТ 11293-89. Желатин. Технические условия // Docs.cntd.ru. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200023164> (дата обращения: 17.03.2024).

² ТР ЕАЭС 040/2016. Технический регламент Евразийского экономического союза «О безопасности рыбы и рыбной продукции» // Docs.cntd.ru. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/420394425?ysclid=m4hyb4ekx326852996> (дата обращения: 12.07.2024).

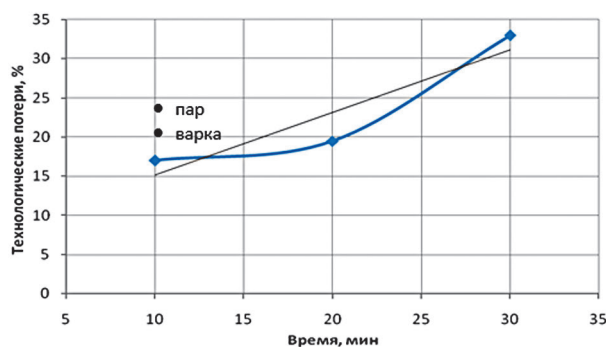


Рис. 1. Динамика технологических потерь при обработке макруруса методом су-вид при 60 °С (точками обозначены потери при других способах термообработки)

Fig. 1. Dynamics of technological losses during giant grenadier processing by sous-vide at 60 °C (points indicate losses at other methods of heat treatment)

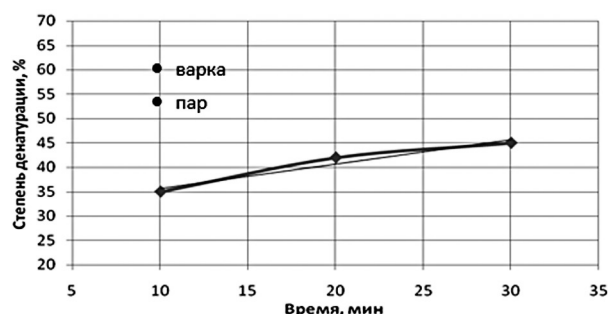


Рис. 2. Динамика денатурационных изменений миофибриллярных белков мышечной ткани макруруса при обработке методом су-вид при 60 °С (точками обозначена степень денатурации при других методах термообработки)

Fig. 2. Dynamics of denaturation of the myofibrillar proteins of the giant grenadier muscle tissue during sous-vide processing at 60 °C (points indicate the degree of denaturation at other methods of heat treatment)

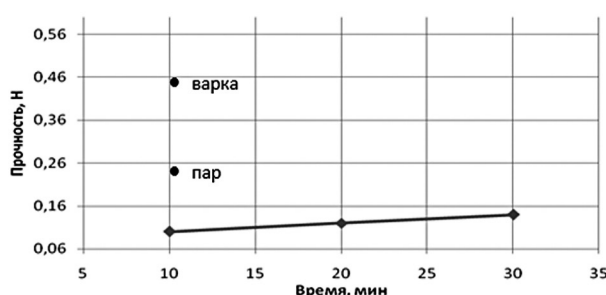


Рис. 3. Изменения прочности мышечной ткани макруруса при обработке методом су-вид при 60 °С (точками обозначена прочность при других методах термообработки)

Fig. 3. Changes in the strength of the giant grenadier muscle tissue during sous-vide processing at 60 °C (points indicate strength with other heat treatment methods)

изменялись, но были значительно ниже, чем при других способах обработки (рис. 3).

По мере увеличения времени обработки методом су-вид был отмечен незначительный прирост других реологических показателей (твердости, упругости и др.). Исключением явилась адгезивность, показавшая тенденцию к снижению. Наиболее прочными и упругими были образцы, отваренные в воде, что тем не менее не обеспечивало сохранения их целостности.

Полученные данные позволяют говорить о том, что все использованные методы не обеспечивают необходимых показателей качества при обработке филе макруруса. В связи с этим дальнейшие эксперименты были направлены на предварительное обеспечение реструктуризации мышечной ткани макруруса с использованием трансглутаминазы для формирования ковалентных сшивок между отдельными молекулами белка [12–14]. Эти сшивки могут образовываться как между молекулами аналогичных белков (например, миозинов), так и между различными белками, в том числе вводимыми извне (например, коллагеном или казеином). Проведенные ранее исследования показали эффективность применения различных специфичных для трансглутаминазы субстратов с целью реструктуризации мышечной ткани рыб. Среди них наиболее эффективными были желатин, казеин, а также растворимые производные хитозана [14–16].

В настоящее время вопросы безопасности использования препаратов трансглутаминазы в пищевой промышленности не имеют однозначного решения. Большинство научных исследований подтверждает отсутствие реакционного действия этого фермента в продуктах после термической обработки [2, 12, 14]. Согласно постановлению Европейского Парламента и Совета № 1169 от 25 октября 2011 года, трансглутаминазы являются вспомогательным веществом, не исполняют технологической функции в конечном продукте, поэтому их не следует указывать на этикетке в перечне компонентов³. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (англ.: Food and Drug Administration, FDA) определило, что, согласно выводам научной группы экспертов, препарат трансглутаминазы Activa признан безопасным (имеет сертификат GRAS – Generally recognized as safe / Общепризнанный как безопасный) для использования в продуктах, контролируемых FDA, включая продукты из мяса, птицы и рыбы, сыры, йогурт, замороженные десерты, блюда из растительного белка, заменители мяса, пасту, хлебобулочные, кондитерские, готовые крупяные изделия, пиццу, тесто и зерновые смеси.

В то же время в Российской Федерации, где регулирование использования ферментных препаратов происходит согласно техническому регламенту Таможенного союза ТР ТС 029/2012⁴, данный препарат отсутствует в списке разрешенных добавок. В связи с этим предлагаемые нами результаты могут быть рассмотрены в настоящий

³ Регламент (ЕС) № 1169/2011 Европейского Парламента и Совета от 25 октября 2011 года о предоставлении потребителям информации о пищевых продуктах // Fsvps.gov.ru. Режим доступа: <https://fsvps.gov.ru/files/reglament-es-1169-2011-evropejskogo-parlam/> (дата обращения: 13.12.2024).

⁴ ТР ТС 029/2012. Технический регламент Таможенного союза «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» // Docs.cntd.ru. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/902359401?ysclid=m4i2978yfo120915691> (дата обращения: 12.12.2024)..

момент только в качестве научного обоснования процессов структурообразования в мышечных системах.

Для проведения экспериментов были подготовлены образцы, состав которых представлен в табл. 1.

Таблица 1. Состав экспериментальных образцов

Table 1. Composition of experimental samples

Компонент	Образец			
	1	2	3	4
Фарш макруруса, %	100	99	94	93
Трансглютаминаза, %	–	1	1	1
Желатин, %	–	–	5	5
Лактат хитозана, %	–	–	–	1

Подготовку образцов проводили следующим образом: образец 1 – измельченную мышечную ткань помещали в пакеты, вакуумировали, обрабатывали при 60 °С 10 мин; образец 2 – к измельченной мышечной ткани добавляли трансглютаминазу, предварительно растворенную в минимальном количестве воды, перемешивали, помещали в пакеты, выдерживали при 40 °С в течение 2 ч, вакуумировали, обрабатывали при 60 °С 10 мин; образец 3 – к измельченной мышечной ткани добавляли водорастворимый желатин, перемешивали, после добавления трансглютаминазы повторяли действия, изложенные в предыдущем пункте; образец 4 – к измельченной мышечной ткани добавляли водорастворимый желатин, перемешивали, добавляли лактат хитозана, перемешивали, после добавления трансглютаминазы повторяли действия, изложенные в предыдущем пункте. Органолептические свойства полученных продуктов представлены в табл. 2.

Полученные результаты подтверждают установленные нами ранее данные о том, что концентрация собственных миофибриллярных белков в мышечной ткани макруруса малогазого недостаточна для образования устойчивой полимерной сети. Только введение дополнительных белковых и/или углеводных субстратов инициирует формирование полимерной сети, стабилизирующей структуру мышечного геля [10, 12, 16]. Отмечено влияние субстратов на цвет и запах продуктов. Результаты измерения реологических показателей образцов представлены в табл. 3.

Для измерений были взяты только образцы 2, 3 и 4, так как жидкая консистенция образца 1 (без добавок)

Таблица 3. Реологические свойства образцов фарша мышечной ткани макруруса с добавлением трансглютаминазы и субстратов после обработки методом су-вид

Table 3. Rheological properties of samples of the minced giant grenadier muscle tissue with the addition of transglutaminase and substrates after sous-vide processing

Показатель	Образец		
	2	3	4
Прочность, Н	0,69±0,09	0,84±0,06	0,58±0,06
Твердость, г	69,50±4,12	84,00±5,07	49,50±3,81
Сила сцепления, г	1,50±0,02	1,50±0,02	2,50±0,03
Адгезивность, мДж	0,02±0,01	0,03±0,03	0,06±0,03
Коэффициент упругости, %	0,25±0,06	0,23±0,04	0,25±0,04

не позволила получить достоверные данные. Прочность всех анализируемых образцов фарша макруруса, подвергнутого ферментативной обработке, была выше, чем у образцов филе. При прочих равных условиях добавление желатина позволило увеличить прочность образцов почти на 12%, а присутствие лактата хитозана снизило этот показатель почти на ту же величину. Будет правильным отметить, что при этом образцы с лактатом хитозана сохраняли целостность и не имели отделяемой влаги в отличие от образцов без дополнительных субстратов.

Для того чтобы установить изменения фракционного состава белков и их молекулярно-массового распределения, был применен метод электрофореза (рис. 4).

Сравнение полученных результатов с результатами проведенных ранее исследований [10] для исходного сырья без применения технологии су-вид, но с добавлением трансглютаминазы и аналогичных субстратов позволяет говорить о том, что режим тепловой обработки не изменяет направленности процессов ферментативной полимеризации и комплексообразования между мышечными белками и желатином и хитозаном. Без ферментирования в мышечной ткани макруруса и до, и после обработки методом су-вид преобладали водорастворимые белки с молекулярной массой 43–52 кДа, относящиеся к группе миофибриллярных белков с молекулярной массой более 220 кДа составили меньшую часть. Незначительные отличия между этими образцами связаны с перераспределением компонентов, имеющих молекулярную массу в диапазоне 53–110 кДа.

Таблица 2. Органолептические свойства образцов из мышечной ткани макруруса с добавлением трансглютаминазы и субстратов после обработки методом су-вид

Table 2. Organoleptic properties of samples from giant grenadier muscle tissue with the addition of transglutaminase and substrates after sous-vide processing

Образец	Цвет	Запах	Консистенция	Прочее
1	Молочно-белый	Свойственный данному виду рыбной продукции	Жидкая, однородная	Большое количество отстоя
2	Молочно-белый	Свойственный данному виду рыбной продукции	Мягкая, однородная	Частичное отделение жидкой фракции
3	Молочный с желтоватым оттенком	Слабый оттенок рыбного запаха	Плотная	Отсутствие отстоя
4	Молочный с желтоватым оттенком	Слабый оттенок рыбного запаха	Плотная, пористая	Отсутствие отстоя

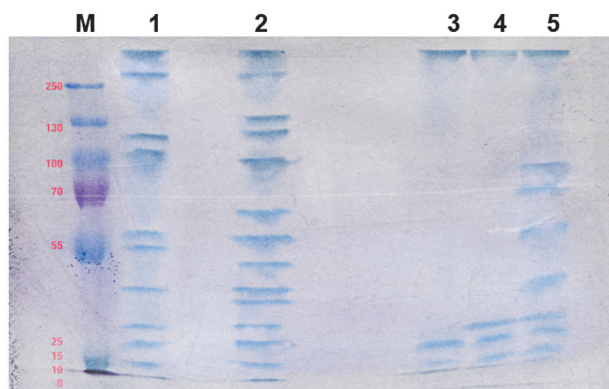


Рис. 4. Электрофореграмма разделения белковых фракций в 10%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия для образцов мышечной ткани макруруса: М – маркеры молекулярной массы; 1 – обработка методом су-вид без добавок; 2 – без обработки, без добавок; 3 – добавление трансглутаминазы, желатина, лактата хитозана, обработка методом су-вид; 4 – добавление трансглутаминазы, желатина, обработка методом су-вид; 5 – добавление трансглутаминазы, обработка методом су-вид

Fig. 4. Electrophoregram of the separation of protein fractions in 10% polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate for giant grenadier muscle tissue: M – molecular weight markers; 1 – sous-vide without additives; 2 – without processing, without additives; 3 – adding transglutaminase, gelatin, chitosan lactate, sous-vide; 4 – adding transglutaminase, gelatin, sous-vide; 5 – adding transglutaminase, sous-vide

Для расчета молекулярной массы белковых фракций использовали денситометрию (табл. 4).

При добавлении трансглутаминазы и последующей обработке методом су-вид наблюдали следующее перераспределение белковых фракций: снижение общего количества фракций как водорастворимых, так и миофибриллярных белков, вероятно, за счет образования высокомолекулярных конъюгатов, не входящих в диапазон, определяемый использованными маркерами. Более значительные изменения в распределении фракций наблюдали после воздействия трансглутаминазы в присутствии желатина и лактата хитозана. Желатин является хорошим субстратом для трансглутаминазы, степень его полимеризации имеет прямую зависимость от концен-

трации трансглутаминазы. Известно, что добавление хитозана улучшает реологические свойства рыбных продуктов со слабой гелеобразующей способностью, зависит от типа и концентрации используемого хитозана и системы, в которую его добавляют. Предполагают, что воздействие на текстуру мышечной ткани рыб может быть связано с его влиянием на ферментативную активность эндогенной трансглутаминазы. В то же время хитозан сам по себе способен к гелеобразованию и может образовывать собственную полимерную сетку внутри продукта [15–17].

Наблюдаемые нами изменения молекулярно-массового распределения белков мышечной ткани макруруса в присутствии систем желатин + трансглутаминаза и желатин + хитозан + трансглутаминаза свидетельствуют об отсутствии практически всех белковых фракций в диапазоне от 15 до 220 кД. В этих образцах визуализируются только фракции низкомолекулярных компонентов (меньше 28 кД для желатина + трансглутаминазы и меньше 15 кД для желатина + хитозана + трансглутаминазы) и высокомолекулярные конъюгаты (280 кД и более). Наиболее очевидны данные изменения для системы желатин + хитозан + трансглутаминаза. Это свидетельствует о том, что указанные компоненты способны связывать как саркоплазматические, так и миофибриллярные белки мышечной ткани макруруса.

Несмотря на сходство в распределении белковых фракций, образцы с добавлением лактата хитозана имели пористость и меньшую прочность, что указывает на различия в образуемых полимерных структурах.

На следующем этапе работы были проведены исследования изменения органолептических, физико-химических и микробиологических показателей продукции для определения ее хранимостепени. Хранение проводили при температуре минус 18 °С, пробы отбирали через 2 и 6 месяцев хранения. За этот период существенных изменений физико-химических показателей, степени денатурации белка и прочности готового продукта отмечено не было.

При изучении микробиологических показателей определяли изменение количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в готовом продукте по истечении 2 и 6 месяцев морозильного хранения при температуре минус 18±2 °С, обсемененность всех образцов была в пределах нормы (5×10^4 КОЕ/г) и не превышала 10^2 КОЕ/г.

Таблица 4. Молекулярно-массовое распределение белковых фракций при разделении образцов фарша макруруса методом электрофореза в 10%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, кДа

Table 4. Molecular mass distribution of protein fractions for separation of the muscle tissue of giant grenadier patterns by electrophoresis in 10% polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate, kDa

Образец	Фракция												
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
	Молекулярная масса, кДа												
1	10	15	28		48		68		100	110		225	280
2	10	15	28	30	48	53	68	80	100	110	125	225	280
3	10	15											280
4	10	15	28										280
5	10	15	28	30	48	53	68	80					280

Таблица 5. Влияние температуры инкубации образцов макруруса на рост психрофильной микрофлоры

Table 5. Effect of the incubation temperature of giant grenadier samples on the growth of psychrophilic microflora

Образец	Рост микроорганизмов, КОЕ/г		
	при 5 °С	при 20 °С	при 36 °С
Фарш без добавок	8,0×10 ²	1,5×10 ³	отсутствует
Фарш + трансклутаминаза	6,3×10 ³	8,5×10 ³	отсутствует
Фарш + трансклутаминаза + желатин	2,4×10 ³	6,2×10 ³	отсутствует
Фарш + трансклутаминаза + желатин + лактат хитозана	отсутствует	6,0×10 ²	отсутствует

Также в хранившихся образцах исследовали количество психрофильных микроорганизмов. Известно, что качественный состав микрофлоры на поверхности свежельвленной рыбы близок к составу микрофлоры морской воды. В основном это психрофильные микроорганизмы с оптимумом развития около 20 °С, способные размножаться при низких температурах. В большей степени данная микрофлора представлена грамотрицательными бактериями, в меньшей степени – грамположительными, спорообразующие аэробные бактерии на поверхности рыбы отсутствуют. Ввиду своих выраженных протеолитических свойств присутствующие бактерии играют решающую роль в процессе порчи рыбной продукции [18]. При хранении рыбы их количество в объеме всей микрофлоры быстро возрастает⁵. В табл. 5 представлены результаты подсчетов роста психрофильных микроорганизмов в исследованных образцах из фарша макруруса при различных температурах инкубации.

Рост выделенных психрофильных микроорганизмов наблюдался в глубине питательного агара, что характерно для анаэробных форм, образованные колонии были мелкими и тонкими – не более 2 мм в диаметре. Общее число микроорганизмов во всех образцах было в границах нормы, однако в образцах с добавлением лактата хитозана роста микроорганизмов при 5 °С не наблюдали, а при 20 °С он был на порядок меньше, чем во всех остальных образцах. Указанные данные подтверждают сведения об антимикробных свойствах хитозана и его производных, добавляемых в пищевые продукты [19, 20].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в течение 6 месяцев морозильного хранения образцы

готовой продукции из макруруса малогазлого сохраняли микробиологическую безопасность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обработка филе макруруса малогазлого методом су-вид приводила к существенным технологическим потерям, снижению прочности и потере целостности готового продукта. Степень денатурации миофибриллярных белков при этом снижалась прямо пропорционально времени теплового воздействия. Обеспечение приемлемой текстуры, соответствующей формованным изделиям из мышечной ткани макруруса, может быть достигнуто при добавлении трансклутаминазы в присутствии желатина и лактата хитозана для сшивки белковых молекул и образования гетерогенных конъюгатов и повышения прочности. Изучение фракционного состава белков и их молекулярно-массового распределения методом электрофореза показало перераспределение белковых фракций, при котором отмечено снижение числа фракций саркоплазматических и миофибриллярных белков за счет образования высокомолекулярных сополимеров. Хранимоспособность полученных образцов в течение 6 месяцев при температуре минус 18 °С обеспечивается практически полным отсутствием изменений в степени денатурации белков и прочности продукции после размораживания и микробиологической безопасностью. Установлено снижение общего числа микроорганизмов, включая психрофильные формы, при добавлении лактата хитозана. Полученные результаты позволяют дать обоснование для разработки технологии формованных изделий из объекта глубоководного промысла – макруруса малогазлого.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Abel N., Rotabakk B.T., Lerfall J. Mild processing of seafood – a review // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2022. Vol. 21, no. 1. P. 340–370. DOI: 10.1111/1541-4337.12876.
2. Jermann C., Koutchma T., Margas E., Leadley C., Ros-Polski V. Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world // *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2015. Vol. 31. P. 14–27. DOI: 10.1016/j.ifset.2015.06.007.
3. Rodgers S. Minimally processed functional foods: technological and operational pathways // *Journal of Food Science*. 2016. Vol. 81, no. 10. P. R2309–R2319. DOI: 10.1111/1750-3841.13422.
4. Baldwin D.E. Sous vide cooking: a review // *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2012. Vol. 1, no. 1. P. 15–30. DOI: 10.1016/j.ijgfs.2011.11.002.
5. Фофанова Т.С. Технология су-вид – некоторые аспекты качества и микробиологической безопасности // *Теория и практика переработки мяса*. 2018. Т. 3. N 1. С. 59–68. DOI: 10.21323/2414-438X-2018-3-1-59-68. EDN: YUDWZJ.
6. Cui Z., Yan H., Manoli T., Mo H., Bi J., Zhang H. Advantage and challenge of sous vide cooking // *Food Science and Technology Research*. 2021. Vol. 27, no. 1. P. 25–34. DOI: 10.3136/fstr.27.25.
7. Erdem N., Karakaya M., Babaoğlu A.S., Unal K. Effects of sous vide cooking on physicochemical, structural and microbiological characteristics of cuttlefish, octopus and squid // *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2022. Vol. 31, no. 7. P. 636–648. DOI: 10.1080/10498850.2022.2092433.
8. Cropotova J., Mozuraityte R., Standal I.B., Rustad T. The influence of cooking parameters and chilled storage time on quality of sous-vide Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) //

⁵ Ким И.Н., Кращенко В.В. Микробиология переработки водных биологических ресурсов: учеб. пособие для вузов. М.: Моркнига, 2015. 349 с.

Journal of Aquatic Food Product Technology. 2019. Vol. 28, no. 5. P. 505-518. DOI: 10.1080/10498850.2019.1604595.

9. Pivnenko T.N., Karpenko Yu.V., Krashchenko V.V., Pozdnyakova Yu.M., Esipenko R.V. Biochemical factors affecting the quality of products and the technology of processing deep-sea fish, the Giant Grenadier *Albatrossia pectoralis* // Journal of Ocean University of China. 2020. Vol. 19. P. 681-690. DOI: 10.1007/s11802-020-4273-z.

10. Пивненко Т.Н., Карпенко Ю.В., Позднякова Ю.М., Кращенко В.В., Есипенко Р.В. Обоснование условий применения трансклутаминазы в технологии формованной продукции из обводненного рыбного сырья // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 2. С. 205-215. DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-2-205-215. EDN: WJWUSG.

11. Карпенко Ю.В., Панчишина Е.М., Скальская В.А. Оценка показателей качества и безопасности рыбной кулинарной продукции, полученной по технологии sous vide (су-вид) // Научные труды Дальрыбвтуза. 2019. Т. 48. N 2. С. 52-61. EDN: YLDBGW.

12. Пивненко Т.Н. Применение трансклутаминазы в пищевой промышленности // Научные труды Дальрыбвтуза. 2021. Т. 55. N 1. С. 5-22. EDN: ERKAKN.

13. Rachel N.M., Pelletier J.N. Biotechnological applications of transglutaminases // Biomolecules. 2013. Vol. 3, no. 4. P. 870-888. DOI: 10.3390/biom3040870.

14. Kieliszek M., Misiewicz A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review // Folia Microbiologica. 2014. Vol. 59. P. 241-250. DOI: 10.1007/s12223-013-0287-x.

15. Benjakul S., Visessanguan W., Tanaka M., Ishizaki S., Suthidham R., Sungpech O. Effect of chitin and chitosan on gelling properties of surimi from barred garfish (*Hemiramphus far*) // Journal of the Science Food and Agriculture. 2001. Vol. 81, no. 1. P. 102-108. DOI: 10.1002/1097-0010(20010101)81:1<102::AID-JSFA792>3.0.CO;2-O.

16. Gómez-Guillén M.C., Montero P., Solas M.T., Pérez-Mateos M. Effect of chitosan and microbial transglutaminase on the gel forming ability of horse mackerel (*Trachurus* spp.) muscle under high pressure // Food Research International. 2005. Vol. 38, no. 1. P. 103-110. DOI: 10.1016/j.foodres.2004.09.004.

17. Huang M., Xu Y., Xu L., Bai Y., Xu X. Interactions of water-soluble myofibrillar protein with chitosan: phase behavior, microstructure and rheological properties // Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2022. Vol. 78. P. 103013. DOI: 10.1016/j.ifset.2022.103013.

18. Mol S., Erkan N., Üçok D.Ş., Tosun Y. Effect of psychrophilic bacteria to estimate fish quality // Journal of Muscle Food. 2007. Vol. 18, no. 1. P. 120-128. DOI: 10.1111/j.1745-4573.2007.00071.x.

19. Максимова С.Н., Сафронова Т.М., Суровцева Е.В. Использование хитозана в технологии пищевых продуктов из водных биоресурсов // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2017. N 2-3. С. 35-40. EDN: ZAUJYL.

20. Kabanov V.L., Novinyuk L.V. Chitosan application in food technology: a review of recent advances // Пищевые системы. 2020. Т. 3. N 1. С. 10-15. DOI: 10.21323/2618-9771-2020-3-1-10-15. EDN: VYTAIH.

REFERENCES

1. Abel N., Rotabakk B.T., Lerfall J. Mild processing of seafood – a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2022;21(1):340-370. DOI: 10.1111/1541-4337.12876.

2. Jermann C., Koutchma T., Margas E., Leadley C., Ros-Polski V. Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2015;31:14-27. DOI: 10.1016/j.ifset.2015.06.007.

3. Rodgers S. Minimally processed functional foods: technological and operational pathways. *Journal of Food Science*. 2016;81(10):R2309-R2319. DOI: 10.1111/1750-3841.13422.

4. Baldwin D.E. Sous vide cooking: a review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 2012;1(1):15-30. DOI: 10.1016/j.ijgfs.2011.11.002.

5. Fofanova T.S. Sous vide technology – several aspects of quality and microbiological safety. *Theory and practice of meat processing*. 2018;3(1):59-68. (In Russian). DOI: 10.21323/2414-438X-2018-3-1-59-68. EDN: YUDWZJ.

6. Cui Z., Yan H., Manoli T., Mo H., Bi J., Zhang H. Advantage and challenge of sous vide cooking. *Food Science and Technology Research*. 2021;27(1):25-34. DOI: 10.3136/fstr.27.25.

7. Erdem N., Karakaya M., Babaoğlu A.S., Unal K. Effects of sous vide cooking on physicochemical, structural and microbiological characteristics of cuttlefish, octopus and squid. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2022;31(7):636-648. DOI: 10.1080/10498850.2022.2092433.

8. Cropotova J., Mozuraityte R., Standal I.B., Rustad T. The influence of cooking parameters and chilled storage time on quality of sous-vide Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*).

Journal of Aquatic Food Product Technology. 2019;28(5):505-518. DOI: 10.1080/10498850.2019.1604595.

9. Pivnenko T.N., Karpenko Yu.V., Krashchenko V.V., Pozdnyakova Yu.M., Esipenko R.V. Biochemical factors affecting the quality of products and the technology of processing deep-sea fish, the Giant Grenadier *Albatrossia pectoralis*. *Journal of Ocean University of China*. 2020;19:681-690. DOI: 10.1007/s11802-020-4273-z.

10. Pivnenko T.N., Karpenko Yu.V., Pozdnyakov Yu.M., Krashchenko V.V., Esipenko R.V. Application of transglutaminase in moulded food processing from waterlogged fish raw materials. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):205-215. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-2-205-215. EDN: WJWUSG.

11. Karpenko Ju.V., Panchishina E.M., Skalskaya V.A. The evaluation of quality and safety indicators ready-to-eat fish products by sous vide. *Scientific Journal of the Far East State Technical Fisheries University*. 2019;48(2):52-61. (In Russian). EDN: YLDBGW.

12. Pivnenko T.N. Application of transglutaminase in the food industry. *Scientific Journal of the Far East State Technical Fisheries University*. 2021;55(1):5-22. (In Russian). EDN: ERKAKN.

13. Rachel N.M., Pelletier J.N. Biotechnological applications of transglutaminases. *Biomolecules*. 2013;3(4):870-888. DOI: 10.3390/biom3040870.

14. Kieliszek M., Misiewicz A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*. 2014;59:241-250. DOI: 10.1007/s12223-013-0287-x.

15. Benjakul S., Visessanguan W., Tanaka M., Ishizaki S., Suthidham R., Sungpech O. Effect of chitin and chitosan on gelling properties of surimi from barred garfish (*Hemiramphus far*). *Journal of the Science Food and Agriculture*. 2001;81(1):102-108. DOI: 10.1002/1097-0010(20010101)81:1<102::AID-JSFA792>3.0.CO;2-O.

16. Gómez-Guillén M.C., Montero P., Solas M.T., Pérez-Mateos M. Effect of chitosan and microbial transglutaminase on the gel forming ability of horse mackerel (*Trachurus spp.*) muscle under high pressure. *Food Research International*. 2005;38(1):103-110. DOI: 10.1016/j.foodres.2004.09.004.

17. Huang M., Xu Y., Xu L., Bai Y., Xu X. Interactions of water-soluble myofibrillar protein with chitosan: phase behavior, microstructure and rheological properties.

Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2022;78:103013. DOI: 10.1016/j.ifset.2022.103013.

18. Mol S., Erkan N., Üçok D., Ş., Tosun Y. Effect of psychrophilic bacteria to estimate fish quality. *Journal of Muscle Food*. 2007;18(1):120-128. DOI: 10.1111/j.1745-4573.2007.00071.x.

19. Maksimova S.N., Safronova T.M., Surovtseva E.V. Use of chitosanin technology of foodstuff from aquatic bioresources. *Izvestiya vuzov. Food technology*. 2017;2-3:35-40. (In Russian). EDN: ZAUJYL.

20. Kabanov V.L., Novinyuk L.V. Chitosan application in food technology: a review of recent advances. *Food systems*. 2020;3(1):10-15. DOI: 10.21323/2618-9771-2020-3-1-10-15. EDN: VYTAIH.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Пивненко Татьяна Николаевна,

д.б.н., профессор, профессор,
Дальневосточный государственный
технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б,
Российская Федерация,
✉ tnpivnenko@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0002-0330-489X>

Позднякова Юлия Михайловна,

к.т.н., директор,
Научно-исследовательский институт
инновационных биотехнологий,
Дальневосточный государственный
технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б,
Российская Федерация,
pozdneyakova.julia@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9078-0850>

Панчишина Екатерина Мироновна,

к.т.н., доцент,
Дальневосточный государственный
технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б,
Российская Федерация,
ekaterina.pan.8@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0002-0330-489X-5245>

Есипенко Роман Владимирович,

к.т.н., научный сотрудник,
Научно-исследовательский институт
инновационных биотехнологий,
Дальневосточный государственный
технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б,
Российская Федерация,
azt@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8263-6939>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Tatiana N. Pivnenko,

Dr. Sci. (Biology), Professor, Professor,
Far Eastern State Technical Fisheries University, 52b,
Lugovaia St., Vladivostok, 690087,
Russian Federation,
✉ tnpivnenko@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0002-0330-489X>

Yuliya M. Pozdneyakova,

Cand. Sci. (Engineering), Director,
Innovative Biotechnologies Institute,
Far Eastern State Technical Fisheries University, 52b,
Lugovaia St., Vladivostok, 690087,
Russian Federation,
pozdneyakova.julia@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9078-0850>

Ekaterina M. Panchishina,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Far Eastern State Technical Fisheries University, 52b,
Lugovaia St., Vladivostok, 690087,
Russian Federation,
ekaterina.pan.8@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0002-0330-489X-5245>

Roman V. Esipenko,

Cand. Sci. (Engineering), Researcher,
Innovative Biotechnologies Institute,
Far Eastern State Technical Fisheries University, 52b,
Lugovaia St., Vladivostok, 690087,
Russian Federation,
azt@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8263-6939>

Вклад авторов

Т.Н. Пивненко – постановка задачи, разработка концепции исследования, написание текста статьи.
Е.М. Панчишина – проведение экспериментов, обсуждение результатов.
Ю.М. Позднякова – разработка методологии исследований, обсуждение результатов.
Р.В. Есипенко – проведение экспериментов, обсуждение результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 19.03.2024.
Одобрена после рецензирования 04.06.2024.
Принята к публикации 30.11.2024.

Contribution of the authors

Tatiana N. Pivnenko – problem formulation, research concept development, preparing the text of manuscript.
Ekaterina M. Panchishina – conducting experiments, results discussion.
Yuliya M. Pozdnyakova – research methodology development, results discussion.
Roman V. Esipenko – conducting experiments, 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 19.03.2024.
Approved after reviewing 04.06.2024.
Accepted for publication 30.11.2024.

Научная статья
УДК 577.3
EDN: SRPVFQ
DOI: 10.21285/achb.946



Сравнительный анализ структурно-функциональных особенностей эндоглюканаз с разным температурным оптимумом действия

О.С. Петухова*✉, А.А. Приставка*, Е.А. Приставка**,
Д.Е. Гавриков*, В.П. Саловарова*

*Иркутский государственный университет, Иркутск, Российская Федерация

**Институт солнечно-земной физики СО РАН, Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. Целлюлазы, температурный оптимум которых сдвинут к экстремально высоким или низким значениям, представляют особый интерес, так как их применение позволяет более гибко регулировать технологические условия их промышленного использования. Тем не менее механизмы, объясняющие адаптации ферментов к предельным температурам, полностью не установлены. Целью проведенной работы являлось исследование методами биоинформатики зависимости структуры микробных эндоглюканаз от двух факторов – принадлежности продуцентов к разным таксономическим группам высшего ранга (бактерии, грибы, археи) и температурного оптимума их среды обитания (психро-, мезо- и термофилы). Ферменты, извлеченные из Uniprot и GenBank, анализировались с помощью попарного и множественного выравнивания последовательностей, попарного выравнивания пространственных структур и сравнения аминокислотных профилей. В результате показано, что последовательности кластеризуются в соответствии с систематикой продуцентов и не содержат паттернов, связанных с адаптациями к температурным условиям. В то же время аминокислотный профиль белков зависит также от температурных условий среды обитания микроорганизмов – частоты некоторых аминокислот (E, I, Y, D, Q) достоверно различаются у ферментов с разными температурными оптимумами. Также идентифицирована выборка ферментов с низкой идентичностью последовательностей, но с высоким сходством 3D-структур, включающая как ферменты из близких таксонов, но с разным термооптимумом, так и эндоглюканазы из микроорганизмов, далеких в систематическом отношении, но обитающих в сходных температурных условиях. Помимо прочего, представлено обсуждение возможных механизмов наблюдаемых различий между показателями идентичности разных структурных уровней белка.

Ключевые слова: эндоглюканазы, психрофилы, мезофилы, термофилы, множественное выравнивание, аминокислотный состав

Для цитирования: Петухова О.С., Приставка А.А., Приставка Е.А., Гавриков Д.Е., Саловарова В.П. Сравнительный анализ структурно-функциональных особенностей эндоглюканаз с разным температурным оптимумом действия // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 596–604. DOI: 10.21285/achb.946. EDN: SRPVFQ.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Comparative analysis of the structural and functional features of endoglucanases with different temperature optima

Olga S. Petukhova*✉, Aleksei A. Pristavka*, Egor A. Pristavka**,
Dmitrii E. Gavrikov*, Valentina P. Salovarova*

*Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

**Institute of Solar-Terrestrial Physics SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Cellulases whose temperature optimum is shifted to extremely high or low values are of particular interest since they allow for greater flexibility in controlling the technological conditions of their industrial use.

© Петухова О.С., Приставка А.А., Приставка Е.А., Гавриков Д.Е., Саловарова В.П., 2024

Nevertheless, the mechanisms that explain enzymatic adaptations to limiting temperatures are not fully established. The study was aimed at using bioinformatics methods to examine how the structure of microbial endoglucanases depends on two factors: the belonging of producers to different taxonomic groups of higher rank (bacteria, fungi, and archaea) and the temperature optimum of their habitat (psychro-, meso-, and thermophiles). Enzymes retrieved from Uniprot and GenBank were analyzed via pairwise and multiple sequence alignment, pairwise structural alignment, and comparison of amino acid profiles. It is shown that the sequences cluster according to the systematics of producers and do not contain patterns associated with adaptations to temperature conditions. However, the amino acid profile of proteins depends also on the temperature conditions of the microbial habitat: the frequencies of some amino acids (E, I, Y, D, and Q) differ significantly in enzymes with different temperature optima. The study also identified a set of enzymes with low sequence identity but high similarity of 3D structures. This set includes enzymes from related taxa but with different temperature optima, as well as endoglucanases from microorganisms that are systematically distant while living under similar temperature conditions. Among other things, the possible mechanisms of the observed differences between the identity scores of different structural levels of protein are discussed.

Keywords: endoglucanases, psychrophiles, mesophiles, thermophiles, multiple alignment, amino acid composition

For citation: Petukhova O.S., Pristavka A.A., Pristavka E.A., Gavrikov D.E., Salovarova V.P. Comparative analysis of the structural and functional features of endoglucanases with different temperature optima. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):596-604. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.946. EDN: SRPVFQ.

ВВЕДЕНИЕ

Целлюлазы представляют собой ферменты, гидролизующие 1,4-β-гликозидную связь между остатками глюкозы. Большинство целлюлаз являются мультидоменными белками, содержащими три функционально различающихся домена: каталитический, целлюлозосвязывающий и линкерный фрагмент между ними¹. Целлюлазный комплекс микроорганизмов, как правило, состоит из ферментов нескольких типов, находящихся в синергических отношениях, что позволяет повысить эффективность гидролиза. Ключевую роль в таком комплексе играют эндоглюканызы (КФ 3.2.1.4), которые расщепляют связи, удаленные от концов полимерной цепи, с образованием целлоолигосахаридов и уменьшением степени полимеризации целлюлозы¹ [1, 2].

Целлюлазы выполняют важнейшую биосферную функцию, участвуя в глобальном круговороте углерода [3, 4], но также они находят практическое применение во многих секторах экономики: аграрно-промышленном комплексе, энергетике, целлюлозно-бумажной, пищевой, текстильной промышленности [5, 6]. Технологии, основанные на использовании целлюлаз, экологически безопасны, что дает им преимущества в сравнении с традиционными производствами [7].

В последнее время особый интерес вызывают целлюлазы, температурный оптимум которых сдвинут к экстремально высоким или низким значениям. Термостабильные целлюлазы востребованы из-за более короткого периода гидролиза, меньшего риска загрязнения культуры посторонней микрофлорой и меньших затрат энергии на процесс охлаждения после предварительной обработки [8–11]. Применение холодоактивных ферментов позволяет снизить энергетические расходы на поддержание оптимальной температуры гидролиза [12, 13].

Термостабильность ферментов (в том числе, целлюлаз) связывают со многими факторами: аминокислотным составом, внутримолекулярными связями, гидрофобными

взаимодействиями, компактностью пространственной структуры и т.д. [8, 9]. Белки психрофильных организмов имеют более длинные и гибкие линкеры, которые отличаются от мезофильных аналогов аминокислотным составом и более слабыми внутримолекулярными взаимодействиями [14–17]. В то же время в целом механизмы, объясняющие адаптации целлюлаз к предельным температурам, не установлены. Применение биоинформатических методов может позволить не только понять эти механизмы, но и открыть перспективы в разработке новых биокатализаторов, сохраняющих активность в экстремальных условиях.

Цель проведенного исследования заключалась в выявлении в структуре микробных эндоглюканаз паттернов, связанных с температурными условиями среды обитания их продуцентов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Общая схема исследований представлена на рис. 1

Из GenBank и UniProt было извлечено 105 аминокислотных последовательностей эндоглюканаз – по 35 белков из мезо-, термо- и психрофильных микроорганизмов; 33 последовательности имели грибное происхождение, 59 – бактериальное, 13 – архейное.

Для анализа использовались как полноразмерные последовательности эндоглюканаз, так и фрагменты, соответствующие их каталитическим доменам. Так как для большей части выборки доменная структура не аннотирована, границы фрагментов идентифицировались с помощью ресурса SWISS-MODEL² [18].

Для всех последовательностей были определены частоты встречаемости аминокислот (в процентах). Для сравнения частотных распределений аминокислот у эндоглюканаз с разным температурным оптимумом использовались критерий согласия Пирсона (χ^2) и дискриминантный анализ (Past.4.15).

Множественное выравнивание последовательностей осуществлялось в программе MEGA (11.0.9)³ по алго-

¹ Саловарова В.П., Козлов Ю.П. Эколого-биотехнологические основы конверсии растительных субстратов: учеб. пособие. М.: Издательский дом «Энергия», 2007. 544 с.

² SWISS-MODEL // [Swissmodel.expasy.org/](https://swissmodel.expasy.org/). Режим доступа: <https://swissmodel.expasy.org/> (дата обращения: 17.06.2024).

³ MEGA // [Megasoftware.net](https://www.megasoftware.net/). Режим доступа: <https://www.megasoftware.net/> (дата обращения: 17.06.2024).

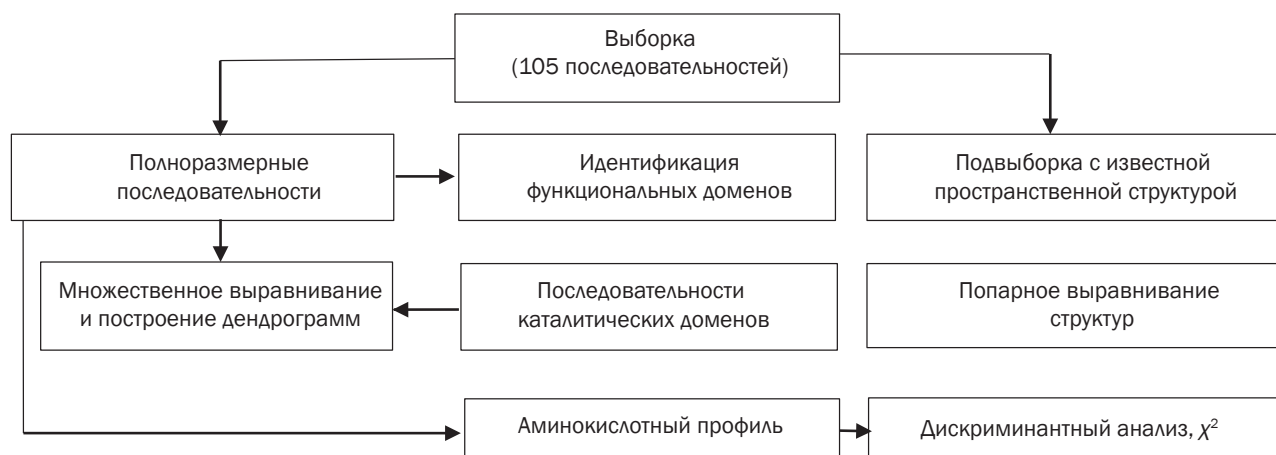


Рис. 1. Общая схема исследований

Fig. 1. General research scheme

ритму ClustalW, а построение дендрограмм – с использованием модели генетических дистанций Maximum Likelihood и модели эволюции белков WAG [19].

Попарное выравнивание последовательностей проводилось в программе BLAST, попарное выравнивание 3D-структур осуществлялось с помощью инструмента Pairwise Structure Alignment⁴.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В литературе уже отмечалось, что температурный оптимум ферментов связан с их аминокислотным составом. В термостабильных ферментах наблюдается большее число заряженных и меньшее число незаряженных полярных остатков, а также повышенное содержание гидрофобных аминокислот. Предпочтительными аминокислотами для белков термофильных организмов считаются глутамат, лизин, тирозин, изолейцин, а для белков мезофилов – глутамин, гистидин, аланин, цистеин

[8, 9, 20]. Гибкость линкера у психрофилов связывают с повышенной долей отрицательно заряженных аминокислотных радикалов и пониженной долей положительно заряженных [8, 9].

Сравнение аминокислотных профилей эндоглюканаз из исследуемой выборки (рис. 2), в принципе, не противоречит этим данным, хотя и не совпадает с ними полностью.

Вероятно, глутамат, изолейцин и тирозин действительно обеспечивают устойчивость ферментов к повышенным температурам, а аспартат и глутамин поддерживают их внутримолекулярную подвижность при низких температурах. При этом не подтвердилось повышенное содержание пролина и аргинина в эндоглюканах из термофилов и пониженное их содержание в психрофильных ферментах, повышенное содержание треонина у психрофилов и пониженное – у термофилов, а также увеличенная доля гистидина у мезофилов (таблица).

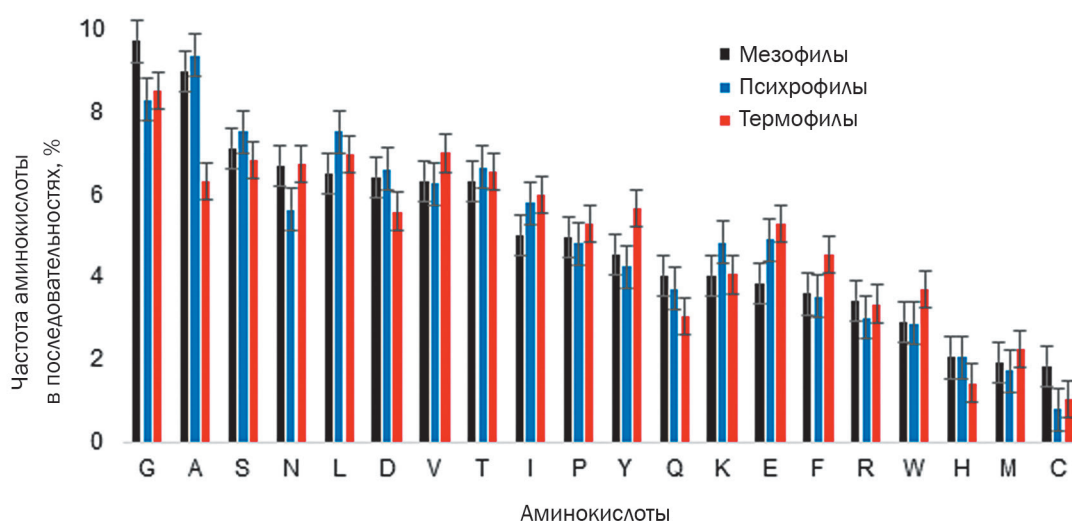


Рис. 2. Относительные частоты встречаемости аминокислотных остатков в последовательностях с разным температурным оптимумом

Fig. 2. Comparative frequencies of occurrence of amino acid residues in sequences with different temperature optima

⁴ Pairwise Structure Alignment // Rcsb.org. Режим доступа: <https://www.rcsb.org/alignment> (дата обращения: 17.06.2024).

Аминокислоты, специфичные к ферментам с разным температурным оптимумом [8, 9, 13–17, 20]

Amino acids specific to enzymes with different temperature optima [8, 9, 13–17, 20]

Экологическая группа продуцентов ферментов	Аминокислоты с более высокими частотами	Аминокислоты с более низкими частотами
Мезофилы	A*, C*, H, Q*	–
Термофилы	E*, I*, K, P, R, V, Y*	C*, H*, N, Q*, S, T
Психрофилы	D*, E, G, Q*, T	P, R

Примечание. Звездочкой помечены аминокислоты, подтверждающие литературные данные.

Влияние таксономических и температурных характеристик ферментов на их аминокислотный профиль показано на графике двумерного распределения в пространстве первых двух дискриминантных функций (рис. 3). Хотя области, соответствующие разным группам ферментов, друг с другом частично перекрываются, частоты корректных отнесений подтверждают принадлежность белков к «своей» группе. Данный показатель составляет 90,5% при разбивке выборки по систематическим категориям и 76,2% по температурному оптимуму, то есть разные группы достоверно разделяются в пространстве двух дискриминантных функций.

При аналогичном сравнении белковых фрагментов, соответствующих каталитическим доменам, были получены результаты, сходные с отображенными на рис. 2 и 3 данными. Таким образом, действительно, ферменты с разным температурным оптимумом отличаются специфичным аминокислотным профилем. Вероятно, повышенное содержание одних аминокислот и пониженное содержание других определяет особенности нативной структуры, от которой зависит, с одной стороны, устойчивость белка к высоким температурам, а с другой – сохранение необходимого уровня внутримолекулярной динамики при низких температурах.

На втором этапе было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, входящих в исследуемую выборку (рис. 4).

В этом случае полные последовательности эндоглюканаз группируются преимущественно в соответствии с мегасистематикой – грибные, бактериальные и архейные белки формируют кластеры, относительно гомогенные в таксономическом плане, но довольно неоднородные по отношению к температуре. Встречаются также отдельные случаи объединения ферментов по температурному признаку: эндоглюканазы психрофильных грибов *Glaciozyma antarctica*, *Aureobasidium pullulans* и *Debaryomyces hansenii* попали в кластеры психрофильных бактерий; ферменты термофильных и гипертермофильных бактерий *Spirochaeta thermophila*, *Dictyoglomus turgidum*, *Thermobispora bispora* и *Thermotoga petrophila* кластеризуются с последовательностями из гипертермофильных архей. Наконец, выделяется наиболее гетерогенная группа, объединяющая гипертермофильную архею *Pyrococcus horikoshii*, 2 вида грибов и 6 видов бактерий с разными температурными оптимумами.

Результаты множественного выравнивания доменных фрагментов принципиально не отличаются – только немного увеличивается неоднородность состава кластеров по таксономическому признаку.

Таким образом, множественное выравнивание не позволило выявить явную взаимосвязь между последовательностями эндоглюканаз и температурными условиями среды обитания микроорганизмов. Имеющиеся примеры высокой идентичности последовательностей из неродственных видов, вероятно, можно объяснить горизонтальным переносом генов и только в последнюю очередь действием естественного отбора.

На заключительном этапе исследований было проведено сравнение пространственного строения ферментов с известными 3D-структурами – таких белков оказалось всего 14 (13,3% от всей выборки). Структуры белков выравнивались попарно с помощью алгоритма TM-align, не зависящего от порядка аминокислот в сравниваемых молекулах. Параллельно проводилось попарное выравнивание аминокислотных последовательностей этих же белков (рис. 5).

Распределения уровней идентичности между последовательностями и между пространственными структурами заметно отличалось. В первом случае

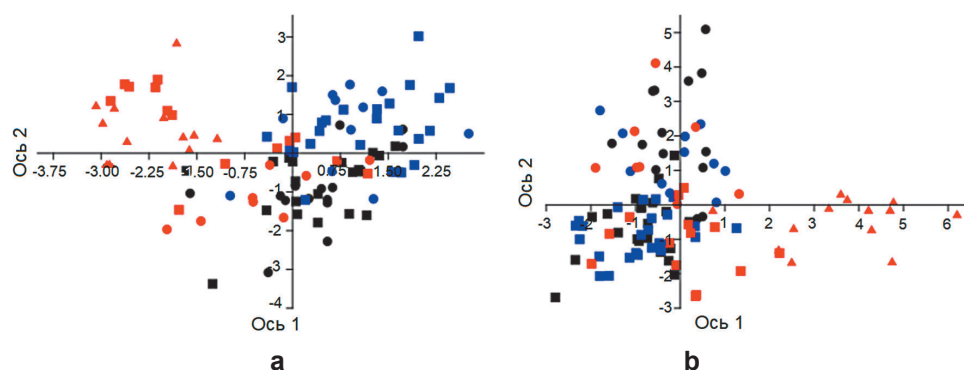


Рис. 3. Распределение частот встречаемости аминокислот у разных групп эндоглюканаз в пространстве первой и второй дискриминантных функций: группирование последовательностей по температурному оптимуму (а) и по таксономической принадлежности (б) (красным цветом маркированы термофильные организмы, черным – мезофильные, синим – психрофильные; круглые маркеры – грибы, квадратные – бактерии, треугольные – археи)

Fig. 3. Frequency distribution of amino acids in different groups of endoglucanases in the space of the first and second discriminant functions: grouping of endoglucanases by temperature optimum (a) and by taxonomic belonging (b) (thermophilic organisms are marked in red, mesophilic in black, psychrophilic in blue; round markers – fungi, square – bacteria, triangular – archaea)

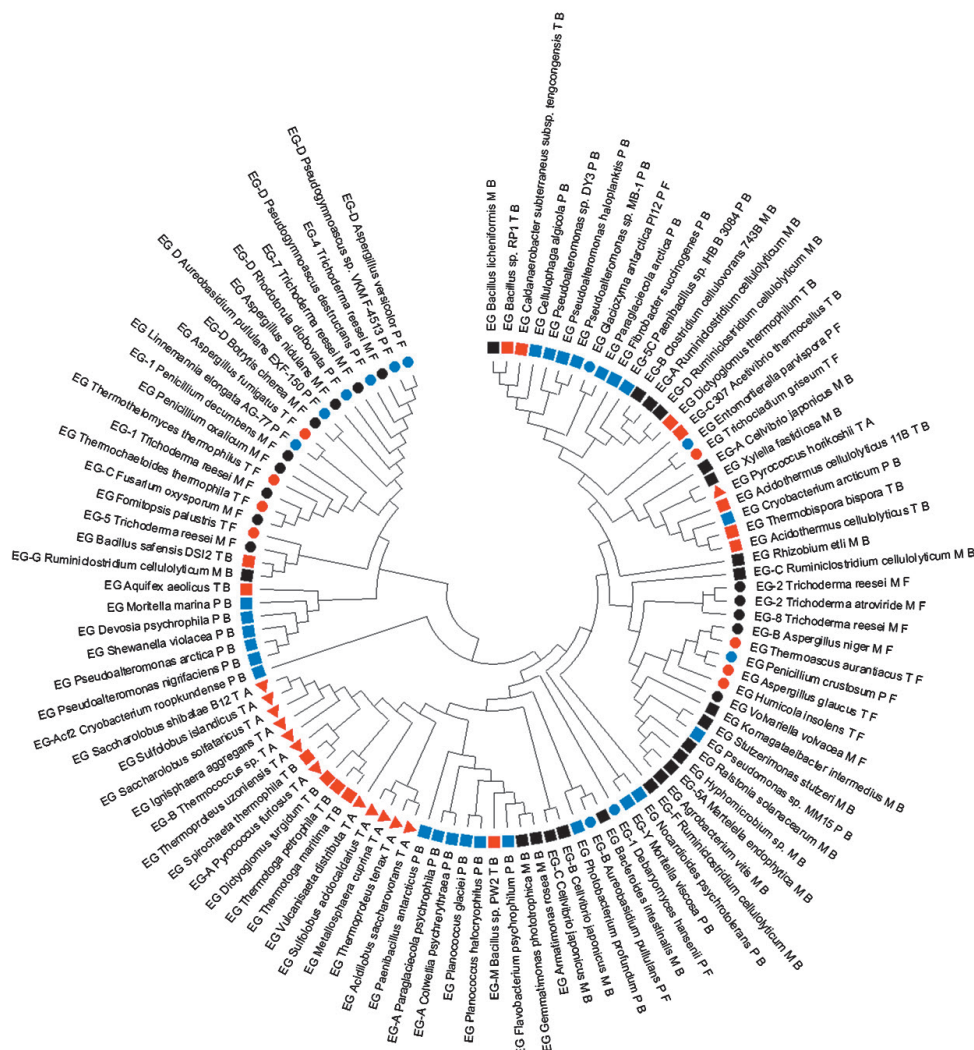


Рис. 4. Дендрограмма полноразмерных последовательностей эндоглюканаз (маркировка ферментов аналогична приведенной на экспликации к рис. 3)

Fig. 4. Dendrogram of full-size sequences of endoglucanases (the marking of enzymes is similar to Fig. 3)

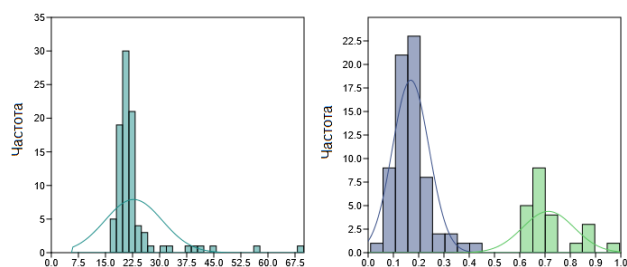


Рис. 5. Распределения показателей сходства при попарном выравнивании аминокислотных последовательностей (а) и пространственных структур (b) 14 эндоглюканаз (по оси абсцисс – идентичность, % (а) и TM-score (b))

Fig. 5. Distributions of identity values in pairwise alignment of amino acid sequences (a) and 3D-structures (b) of endoglucanases (the x-axis shows identity, % (a) and TM-score (b))

оно имеет характер нормального распределения с очень низкими средним (22,8%) и медианным (20,8%) значениями. Распределение уровней идентичности фолдов имеет выраженный двухвершинный характер с максимумами при степени сходства 0,16 и 0,67. Другими словами, в исследуемой выборке имеется подвыборка ферментов с низкой идентичностью последовательностей, но с высоким уровнем пространственного сходства. В эту группу входят как ферменты из относительно близкородственных таксонов, но с разным термооптимумом, так и эндоглюканазы из микроорганизмов, далеких в систематическом отношении, но обитающих в сходных температурных условиях. Например, бактериальные эндоглюканазы из мезофильного *Ruminiclostridium cellulolyticum* и термофильного *Acidothermus cellulolyticus* имеют значение TM-score 0,65 и идентичность последовательностей всего в 17%. А термофильные ферменты из археи *Pyrococcus horikoshii* и гриба *Thermoascus aurantiacus* похожи по структуре на 0,62 и по последо-

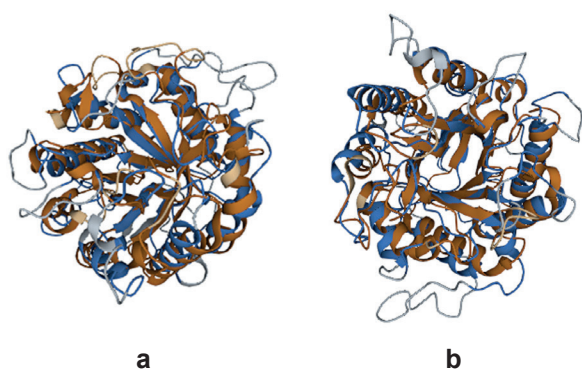


Рис. 6. Пример попарного выравнивания 3D-структур эндоглюканаз: а – *Acidothermus cellulolyticus* (PDB ID: 1ECE) и *Thermoascus aurantiacus* (PDB ID: 1GZJ); б – *Acidothermus cellulolyticus* (PDB ID: 1ECE) и *Pseudoalteromonas haloplanktis* (PDB ID: 1TVN)

Fig. 6. Example of pairwise alignment of endoglucanase 3D-structures: а – *Acidothermus cellulolyticus* (PDB ID: 1ECE) and *Thermoascus aurantiacus* (PDB ID: 1GZJ); б – *Acidothermus cellulolyticus* (PDB ID: 1ECE) and *Pseudoalteromonas haloplanktis* (PDB ID: 1TVN)

вательности на 20%. Термостабильные эндоглюканазы гриба *Thermoascus aurantiacus* и бактерии *Acidothermus cellulolyticus* имеют структурную идентичность 0,65, а идентичность последовательностей 21,8% (рис. 6, а). Соответствующие показатели бактериальных эндоглюканаз из термофила *Acidothermus cellulolyticus* и психрофила *Pseudoalteromonas haloplanktis* составляют 0,68 и 19,3% (рис. 6, б).

Таким образом, функциональные свойства эндоглюканаз могут определяться не столько их первичной структурой, сколько особенностями пространственной организации молекулы. Вероятно, естественный отбор в этом случае работает на закрепление вариантов фолда, наиболее оптимальных для работы ферментов при конкретных условиях, в том числе связанных с температурой среды обитания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В аминокислотных последовательностях исследованных эндоглюканаз не удалось выявить паттерны, связанные с адаптациями ферментов к предельным температурам: различия в первичной структуре ферментов закономерно отражают только принадлежность продуцентов к таксонам высшего ранга – грибам, бактериям и археям. В то же время аминокислотный профиль белков формируется в зависимости как от таксономических характеристик микроорганизмов, так и от температурных условий их среды обитания – относительные частоты некоторых аминокислот (Е, I, Y, D, Q) достоверно различаются у ферментов с разными температурными оптимумами. Следовательно, эти аминокислоты принимают участие в поддержании оптимального (для конкретного температурного диапазона) баланса между устойчивостью молекулярной структуры и ее конформационной подвижностью, необходимой для каталитической активности ферментов. Такой баланс достигается за счет изменения и перераспределения контактов и связей внутри белковой глобулы, что сопровождается возникновением определенной пространственной укладки полипептидной цепи. Результатом подобного сочетания структурных факторов являются эндоглюканазы, которые при низкой идентичности последовательностей характеризуются высоким подобием пространственных структур.

Возможные механизмы столь значимых (в 3–4 раза) различий между показателями идентичности разных структурных уровней белка сводятся к двум альтернативным вариантам: либо это гомологичные белки, которые накопили большое количество аминокислотных замен, но сохранили исходную пространственную «упаковку», либо это неродственные белки, которые приобрели сходную 3D-структуру в процессе адаптации к выполнению конкретных функций. К сожалению, низкая доля в базах данных эндоглюканаз с известным пространственным строением препятствует проведению более глубокого анализа, поэтому для дальнейших исследований в данном направлении необходимо привлечение алгоритмов структурного моделирования.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Клесов А.А., Григораш С.Ю. Ферментативный гидролиз целлюлозы. Регуляторное влияние нерастворимого субстрата на эффективность ферментативной реакции // Биохимия. 1982. Т. 47. N 3. С. 409–418.
2. Singhanian R.R., Adsul M., Pandey A., Patel A.K. Cellulases // Current developments in biotechnology and bioengineering / eds A. Pandey, S. Negi, C.R. Soccol. Elsevier, 2017. P. 73–101. DOI: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00004-X.
3. Ahmed A., Bibi A. Fungal cellulase; production and applications: minireview // LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences. 2018. Vol. 4, no. 1. P. 19–36. DOI: 10.20319/ijlhls.2018.41.1936.
4. Magrey A., Sahay S., Gothwal R. Cellulases for biofuel: a review // International Journal of Recent Trends in Science and Technology. 2018. P. 17–25. Available from: https://www.statperson.com/Journal/ScienceAnd-Technology/Article/SpecialIssue/ACAEE_4.pdf [Accessed 17th June 2024].
5. Srivastava N., Srivastava M., Mishra P.K., Gupta V.K., Molina G., Rodriguez-Couto S., et al. Applications of fungal

- cellulases in biofuel production: advances and limitations // Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2018. Vol. 82. P. 2379–2386. DOI: 10.1016/j.rser.2017.08.074.
6. Chang W.H., Lai A.G. Mixed evolutionary origins of endogenous biomass-depolymerizing enzymes in animals // BMC Genomics. 2018. Vol. 19. P. 483. DOI: 10.1186/s12864-018-4861-0.
7. Thapa S., Mishra J., Arora N., Mishra P., Li H., O'Hair J., et al. Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation // Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 2020. Vol. 19. P. 621–648. DOI: 10.1007/s11157-020-09536-y.
8. Ajeje S.B., Hu Y., Song G., Peter S.B., Afful R.G., Sun F., et al. Thermostable cellulases / xylanases from thermophilic and hyperthermophilic microorganisms: current perspective // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2021. Vol. 9. P. 794304. DOI: 10.3389/fbioe.2021.794304.
9. Akram F., ul Haq I., Aqeel A., Ahmed Z., Shah F.I. Thermostable cellulases: structure, catalytic mechanisms,

directed evolution and industrial implementations // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2021. Vol. 151. P. 111597. DOI: 10.1016/j.rser.2021.111597.

10. Akram F., ul Haq I., Imran W., Mukhtar H. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: a review // *Renewable Energy*. 2018. Vol. 122. P. 225–238. DOI: 10.1016/j.renene.2018.01.095.

11. Cai L.-N., Xu S.-N., Lu T., Lin D.-Q., Yao S.-J. Salt-tolerant and thermostable mechanisms of an endoglucanase from marine *Aspergillus niger* // *Bioresources and Bioprocessing*. 2022. Vol. 9. P. 44. DOI: 10.1186/s40643-022-00533-3.

12. Kasana R.C., Gulati A. Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review // *Journal of Basic Microbiology*. 2011. Vol. 51, no. 6. P. 572–579. DOI: 10.1002/jobm.201000385.

13. Chavan S., Shete A., Mirza Y., Dharne M.S. Investigation of cold-active and mesophilic cellulases: opportunities awaited // *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2023. Vol. 13. P. 8829–8852. DOI: 10.1007/s13399-021-02047-y.

14. Gupta S.K., Kataki S., Chatterjee S., Prasad R.K., Datta S., Vairale M.G., et al. Cold adaptation in bacteria with special focus on cellulase production and its potential application // *Journal of Cleaner Production*. 2020. Vol. 258. P. 120351. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.120351.

15. Yunus G., Kuddus M. Cold-active microbial cellulase: novel approach to understand mechanism and its

applications in food and beverages industry // *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2021. Vol. 10, no. 4. P. 524–530. DOI: 10.15414/jmbfs.2021.10.4.524-530.

16. Yusof N.A., Hashim N.H.F., Bharudin I. Cold adaptation strategies and the potential of psychrophilic enzymes from the Antarctic yeast, *Glaciozyma antarctica* PI12 // *Journal of Fungi*. 2021. Vol. 7, no. 7. P. 528. DOI: 10.3390/jof7070528.

17. Öten A.M., Atak E., Karaca B.T., Firtina S., Kutlu A. Discussing the roles of proline and glycine from the perspective of cold adaptation in lipases and cellulases // *Biocatalysis and Biotransformation*. 2023. Vol. 41, no. 4. P. 243–260. DOI: 10.1080/10242422.2022.2124111.

18. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // *Nucleic Acids Research*. 2018. Vol. 46, no. W1. P. W296–W303. DOI: 10.1093/nar/gky427.

19. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11 // *Molecular Biology and Evolution*. 2021. Vol. 38, no. 7. P. 3022–3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120.

20. Farias S.T., Bonato M.C.M. Preferred amino acids and thermostability // *Genetics and Molecular Research*. 2003. Vol. 2, no. 4. P. 383–393.

REFERENCES

1. Klyosov A.A., Grigorash S.Yu. Enzymatic hydrolysis of cellulose. Regulatory effect of the non-soluble substrate on the effectiveness of the enzymatic reaction. *Biokhimiya*. 1982;47(3):409–418. (In Russian).

2. Singhanian R.R., Adsul M., Pandey A., Patel A.K. Cellulases. In: Pandey A., Negi S., Soccol C.R. (eds). *Current developments in biotechnology and bioengineering*. Elsevier; 2017, p. 73–101. DOI: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00004-X.

3. Ahmed A., Bibi A. Fungal cellulase; production and applications: minireview. *LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences*. 2018;4(1):19–36. DOI: 10.20319/lijhs.2018.41.1936.

4. Magrey A., Sahay S., Gonthalwal R. Cellulases for biofuel: a review. *International Journal of Recent Trends in Science and Technology*. 2018;17–25. Available from: https://www.statperson.com/Journal/ScienceAndTechnology/Article/SpecialIssue/ACAE_4.pdf [Accessed 17th June 2024].

5. Srivastava N., Srivastava M., Mishra P.K., Gupta V.K., Molina G., Rodriguez-Couto S., et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2018;82:2379–2386. DOI: 10.1016/j.rser.2017.08.074.

6. Chang W.H., Lai A.G. Mixed evolutionary origins of endogenous biomass-depolymerizing enzymes in animals. *BMC Genomics*. 2018;19:483. DOI: 10.1186/s12864-018-4861-0.

7. Thapa S., Mishra J., Arora N., Mishra P., Li H., O'Hair J., et al. Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2020;19:621–648. DOI: 10.1007/s11157-020-09536-y.

8. Ajeje S.B., Hu Y., Song G., Peter S.B., Afful R.G., Sun F., et al. Thermostable cellulases / xylanases from thermophilic and hyperthermophilic microorganisms: current

perspective. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:794304. DOI: 10.3389/fbioe.2021.794304.

9. Akram F., ul Haq I., Aqeel A., Ahmed Z., Shah F.I. Thermostable cellulases: structure, catalytic mechanisms, directed evolution and industrial implementations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2021;151:111597. DOI: 10.1016/j.rser.2021.111597.

10. Akram F., ul Haq I., Imran W., Mukhtar H. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: a review. *Renewable Energy*. 2018;122:225–238. DOI: 10.1016/j.renene.2018.01.095.

11. Cai L.-N., Xu S.-N., Lu T., Lin D.-Q., Yao S.-J. Salt-tolerant and thermostable mechanisms of an endoglucanase from marine *Aspergillus niger*. *Bioresources and Bioprocessing*. 2022;9:44. DOI: 10.1186/s40643-022-00533-3.

12. Kasana R.C., Gulati A. Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review. *Journal of Basic Microbiology*. 2011;51(6):572–579. DOI: 10.1002/jobm.201000385.

13. Chavan S., Shete A., Mirza Y., Dharne M.S. Investigation of cold-active and mesophilic cellulases: opportunities awaited. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2023;13:8829–8852. DOI: 10.1007/s13399-021-02047-y.

14. Gupta S.K., Kataki S., Chatterjee S., Prasad R.K., Datta S., Vairale M.G., et al. Cold adaptation in bacteria with special focus on cellulase production and its potential application. *Journal of Cleaner Production*. 2020;258:120351. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.120351.

15. Yunus G., Kuddus M. Cold-active microbial cellulase: novel approach to understand mechanism and its applications in food and beverages industry. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2021;10(4):524–530. DOI: 10.15414/jmbfs.2021.10.4.524-530.

16. Yusof N.A., Hashim N.H.F., Bharudin I. Cold adaptation strategies and the potential of psychrophilic enzymes from the Antarctic yeast, *Glaciozyma antarctica*

PI12. *Journal of Fungi*. 2021;7(7):528. DOI: 10.3390/jof7070528.

17. Öten A.M., Atak E., Karaca B.T., Firtina S., Kutlu A. Discussing the roles of proline and glycine from the perspective of cold adaptation in lipases and cellulases. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2023;41(4):243-260. DOI: 10.1080/10242422.2022.2124111.

18. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., et al. SWISS-MODEL: homology

modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(W1):W296-W303. DOI: 10.1093/nar/gky427.

19. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021;38(7):3022-3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120.

20. Farias S.T., Bonato M.C.M. Preferred amino acids and thermostability. *Genetics and Molecular Research*. 2003;2(4):383-393.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Петухова Ольга Сергеевна,

аспирант,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
✉ petukhova4olga@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0004-7785-4255>

Приставка Алексей Александрович,

к.б.н., доцент, доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
pristavk@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0724-8565>

Приставка Егор Алексеевич,

инженер-программист,
Институт солнечно-земной физики СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 126а,
Российская Федерация,
pristavkaegor03@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0001-6981-0269>

Гавриков Дмитрий Евгеньевич,

к.б.н., доцент, доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
dega.irk@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-0046-7762>

Саловарова Валентина Петровна,

д.б.н., профессор, заведующий кафедрой,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
vsalovarova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3693-9058>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olga S. Petukhova,

Postgraduate Student,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ petukhova4olga@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0004-7785-4255>

Aleksei A. Pristavka,

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Associate Professor,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
pristavk@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0724-8565>

Egor A. Pristavka,

Software Engineer,
Institute of Solar-Terrestrial Physics SB RAS,
126a, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
pristavkaegor03@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0001-6981-0269>

Dmitrii E. Gavrikov,

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Associate Professor,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
dega.irk@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-0046-7762>

Valentina P. Salovarova,

Dr. Sci. (Biology), Professor, Department Chair,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
vsalovarova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3693-9058>

Вклад авторов

О.С. Петухова – сбор данных, проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов, написание текста статьи.

А.А. Приставка – постановка задачи, разработка концепции исследования, обсуждение результатов, написание текста статьи.

Е.А. Приставка – разработка алгоритмов для выполнения исследований, обработка полученных данных.

Д.Е. Гавриков – обработка полученных данных.

В.П. Саловарова – систематизация данных.

Contribution of the authors

Olga S. Petukhova – data collection, conducting experiments, data processing, results discussing, writing the text of manuscript.

Aleksei A. Pristavka – problem formulation, research concept development, results discussing, writing the text of manuscript.

Egor A. Pristavka – development of research algorithms, data processing.

Dmitrii E. Gavrikov – data processing.

Valentina P. Salovarova – data systematization.

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 22.06.2024.

Одобрена после рецензирования 16.09.2024.

Принята к публикации 30.11.2024.

Information about the article

The article was submitted 22.06.2024.

Approved after reviewing 16.09.2024.

Accepted for publication 30.11.2024.

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 4 (51) 2024

12+

**PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
APPLIED CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

Volume 14 No. 4 (51) 2024

Редактор Ф.А. Посысоева

Перевод на английский язык:

А.В. Квеглис, Thomas Beavitt, Е.А. Привалова

Верстка Т.С. Жевлакова

Дата выхода в свет 27.12.2024. Формат 60 x 90 / 8.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 21,5
Тираж 500 экз. Зак. 89. 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