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

12+

Том 15 N 2

2025

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ

Прикладная химия и биотехнология

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия и биотехнология

Том 15 N 2 (53) 2025

ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского
технического университета

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
ПРИКЛАДНАЯ ХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ
Том 15 N 2 (53) 2025

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор:

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

Заместитель главного редактора:

Львов А.Г. д.х.н., профессор кафедры химии и биотехнологии Иркутского национального исследовательского технического университета (Иркутск, Россия)

Члены редакционной коллегии:

Базарнова Ю.Г. д.т.н, профессор, директор Высшей школы биотехнологии и пищевых производств Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (Санкт-Петербург, Россия)

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

Братская С.Ю. д.х.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией сорбционных технологий и функциональных материалов Института химии ДВО РАН (Владивосток, Россия)

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

Верпоорт Фрэнсис доктор наук, профессор, государственная ключевая лаборатория передовых технологий синтеза и обработки материалов, Уханьский технологический университет (Ухань, Китай)

Воронов В.К. д.х.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, профессор-консультант, отделение прикладной математики и информатики Иркутского национального исследовательского технического университета (Иркутск, Россия)

Го Эньцзюнь доктор наук, декан Китайско-российского института химии конструкционных материалов Ляонинского университета науки и технологии (Ляонин, 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 (Москва, Россия)

Жеребцов С.И. д.х.н., главный научный сотрудник, заведующий лабораторией института углехимии и химического материаловедения Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН (Кемерово, Россия)

Непомнящих А.И. д.ф-м.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник лаборатории физики монокристаллов Института геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН (Иркутск, Россия)

Никульшин П.А. д.х.н., заместитель генерального директора по науке АО «Всероссийский научно-исследовательский институт по переработке нефти» (Москва, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

Чхенкели В.А. д.б.н., профессор, генеральный директор ООО «Биотехвет» (Иркутск, Россия)

Шэнь Яньмин профессор, заместитель декана факультета химической инженерии Шеньянского института химической технологии (Шеньян, Китай)

Ответственный секретарь:

Чеснокова А.Н. к.х.н., доцент кафедры химии и биотехнологии Иркутского национального исследовательского технического университета (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, Екатеринбург, ул. Мамина-Сибиряка, 130

Учредитель и издатель:
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Иркутский национальный исследовательский технический университет»
Россия, 664074, Иркутск, ул. Лермонтова, 83

Издательство:
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Иркутский национальный исследовательский технический университет»
Россия, 664074, Иркутск, ул. Лермонтова, 83А

Адрес редакции:
Россия, 664074, Иркутск, ул. Лермонтова, 83, ауд. Е-211
E-mail: biochem@istu.edu

© ФГБОУ ВО «ИРНИТУ», 2025

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
APPLIED CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY
IZVESTIYA VUZOV
PRIKLADNAYA KHIMIYA I BIOTEKHNOLOGIYA
Volume 15 No. 2 (53) 2025

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), Professor, Chemistry and Biotechnology Department, Irkutsk National Research Technical University (Irkutsk, Russia)

Editorial council

Julia G. Bazarnova — Dr. Sci. (Engineering), Professor, Director of the Higher School of Biotechnology and Food Technologies, Institute of Biomedical Systems and Biotechnology, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University (St. Petersburg, Russia)

Gennadiy B. Borovskii — Dr. Sci. (Biology), Professor, Deputy Director of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Irkutsk, Russia)

Svetlana Yu. Bratskaya — Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Correspondent member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Sorption Technologies and Functional Materials, Institute of Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (Vladivostok, Russia)

Sergey D. Varfolomeyev — Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Correspondent member of the Russian Academy of Sciences, Scientific supervisor of N.M. Emmanuel Institute of Biochemical Physics (Moscow, Russia)

Francis Verpoort — Ph.D. (Chemistry), Professor, State Key Laboratory of Advanced Technology for Material Synthesis and Processing, Wuhan University of Technology (Wuhan, China)

Vladimir K. Voronov — Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Consulting Professor, Department of Applied Mathematics and Computer Science, Irkutsk National Research Technical University (Irkutsk, Russia)

Enjun Gao — Dr. Sci., Dean of the Chinese-Russian Institute of Chemistry of Engineering Materials, University of Science and Technology Liaoning (Liaoning, 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)

Sergey I. Zherebtsov — Dr. Sci. (Chemistry), Chief Researcher; Head of the Laboratory of Institute of Coal Chemistry and Chemical Materials Science, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Kemerovo, Russia)

Alexander I. Nepomnyashchikh — Dr. Sci. (Phys.Math.), Professor, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Chief Researcher, Laboratory of Physics of Single Crystals of Vinogradov Institute of Geochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (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 the Mongolian Academy of Sciences (Ulan Bator, Mongolia)

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

Valentina P. Salovarova — Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of Physical and Chemical Biology, Bioengineering and Bioinformatics Department, Irkutsk State University (Irkutsk, Russia)

Sanjib Kumar Panda — Ph.D., Professor, Department of Life Science and 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, Russian Academy of Sciences (Saratov, Russia)

Vera A. Chkhenkeli — Dr. Sci. (Biology), Professor, General Director of OOO Biotechvet (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-Sibiryak 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

© of FGBOU VO "INRTU", 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Кольцов Н.И. Автоколебания в гомогенных химических реакциях, протекающих по линейным стадийным схемам **150**

Субанаков А.К., Ковтунец Е.В., Соболев А.Н., Танхаева А.С. Фазообразование в тройных системах оксидов натрия, редкоземельного металла (скандия, индия, иттербия) и бора **158**

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Делавар А., Шахами С., Собханян А., Ахмади А., Рогани М. Повреждения печени и почек у мышей, вызванные ацетаминофеном: лечение корневищем *Alpinia officinarum* (на англ. яз.) **167**

Гришкова А.В., Белов А.Н, Коваль А.Д., Стурова Ю.Г., Мусина О.Н. Биохимические свойства коммерческих препаратов рекомбинантного химозина **178**

Евстафьев С.Н., Фомина Е.С., Тигунцева Н.П. Термическая этерификация полисахаридов соевой шелухи лимонной кислотой **188**

Агеева Н.М., Ширшова А.А., Храпов А.А. Исследование динамики осветления свежего яблочного сусла различных сортов яблони юга России **196**

Иванова К.Р., Привалова Е.А. Крепленый алкогольный напиток типа портвейн из плодов груши уссурийской **207**

Нечаева И.А., Осина А.Н., Филиппова А.С., Нам Н.В.Т., Мо Л.Т. Штамм *Gordonia amicalis* G2 – продуцент поверхностно-активных веществ биологического происхождения **213**

Тетерина Г.А., Саловарова В.П., Джиоев Ю.П., Арефьева Н.А., Борисенко А.Ю., Букин Ю.С., Эрдынеев С.В., Степаненко Л.А., Антипин Д.А., Кахиани К.Б., Макарова А.Э. Поиск и анализ разнообразия структур CRISPR-Cas-систем патогенных штаммов *Clostridium botulinum* с целью создания экологически безопасных фаговых препаратов **224**

Уразова Я.В., Рожнов Е.Д., Школьникова М.Н. Перспективы использования меланина в качестве антибактериального агента потребительской упаковки **234**

Филинова Н.В., Ищенко А.А., Копытина Т.В., Макарова Л.Е. Влияние *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* на уровень эндогенного пероксида водорода и активность пероксидазы в трансгенных растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.), экспрессирующих ген *gox* **243**

Ядерец В.В., Карпова Н.В., Глаголева Е.В., Цыганов В.А., Шибаева А.С., Джавахия В.В. Оптимизация питательной среды для глубинного культивирования штамма *Mycolicibacterium neoaurum* AC-3067D – продуцента *β*-каротина **252**

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

Кривошеин А.А., Шаглаева Н.С. Влияние состава блок-сополимеров на основе стирола и бутадиена на свойства полимерных битумных вяжущих **262**

Лазарев С.И., Хорохорина И.В., Михайлин М.И., Филимонова О.С. Электрокинетические характеристики электродеионизационной очистки и концентрирования технологических растворов гальванических производств, содержащих ионы кобальта, меди и кадмия **269**

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Непомнящий А.П., Зубков И.Н., Сорокоумов П.Н., Шарова Н.Ю. Оптимизация условий культивирования штамма *Lactobacillus acidophilus* для получения молочной кислоты при ферментации мелассы **279**

CONTENTS

CHEMICAL SCIENCES

Kol'tsov N.I. Self-oscillations in homogeneous chemical reactions proceeding in a linear stepwise manner.. **150**

Subanakov A.K., Kovtunets E.V., Sobolev A.N., Tankhaeva A.S. Phase formation in ternary systems of sodium, rare-earth (scandium, indium, and ytterbium), and boron oxides..... **158**

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Delavar A., Shahami S., Sobhanian A., Ahmadi A., Roghani M. Acetaminophen-induced liver and kidney injuries in mice: treatment with *Alpinia officinarum* rhizome..... **167**

Grishkova A.V., Belov A.N., Koval A.D., Sturova Yu.G., Musina O.N. Biochemical properties of commercial recombinant chymosin preparations..... **178**

Evstaf'ev S.N., Fomina E.S., Tiguntceva N.P. Thermal esterification of soybean husk polysaccharides with citric acid..... **188**

Ageyeva N.M., Shirshova A.A., Khrapov A.A. Clarification dynamics of fresh apple must obtained from different apple cultivars grown in the south of Russia..... **196**

Ivanova K.R., Privalova E.A. Port-like fortified alcoholic beverage produced from Ussurian pear fruit..... **207**

Nechaeva I.A., Osina A.N., Filippova A.S., Nam N.V.T., Mo L.T. *Gordonia amicalis* G2 strain as a producer of biosurfactants..... **213**

Teterina G.A., Salovarova V.P., Dzhioev Yu.P., Arefieva N.A., Borisenko A.Yu., Bukin Yu.S., Erdyneev S.V., Stepanenko L.A., Antipin D.A., Kakhiani K.B., Makarova A.E. Identification and diversity analysis of CRISPR-Cas systems in the pathogenic strains of *Clostridium botulinum* to create eco-friendly phage preparations..... **224**

Urazova Ya.V., Rozhnov E.D., Shkolnikova M.N. Prospects of using melanin as an antimicrobial agent in food packaging..... **234**

Filinova N.V., Ishchenko A.A., Kopytina T.V., Makarova L.E. Effect of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* on endogenous hydrogen peroxide levels and peroxidase activity in transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) expressing the gox gene..... **243**

Yaderets V.V., Karpova N.V., Glagoleva E.V., Tsyganov V.A., Shibaeva A.S., Dzhavakhiya V.V. Optimization of culture medium for submerged cultivation of *Mycolicibacterium neoaurum* AC-3067D – a beta-carotene producing strain..... **252**

CHEMICAL TECHNOLOGY

Krivoshein A.A., Shaglaeva N.S. Effect of styrene/butadiene block copolymer composition on the properties of polymer bitumen binders..... **262**

Lazarev S.I., Khorokhorina I.V., Mikhailin M.I., Filimonova O.S. Electrokinetic characteristics of electrodeionization purification and concentration of electroplating solutions containing cobalt, copper, and cadmium ions..... **269**

BRIEF COMMUNICATION

Nepomniashchii A.P., Zubkov I.N., Sorokoumov P.N., Sharova N.Yu. Optimization of cultivation conditions for *Lactobacillus acidophilus* to produce lactic acid through molasses fermentation..... **279**

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Научная статья
УДК 541.12
EDN: ABYFPO
DOI: 10.21285/achb.976

Автоколебания в гомогенных химических реакциях, протекающих по линейным стадийным схемам

Н.И. Кольцов

Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Российская Федерация

Аннотация. *Колебательные химические и биохимические реакции представляют особенный интерес для понимания сложных механизмов эволюции и самоорганизации в живой природе. В настоящее время незатухающие колебания (автоколебания, осцилляции) обнаружены во многих химических и биологических реакциях: реакциях типа Белоусова – Жаботинского («броматные осцилляторы»), Бриггса – Раушера («иодные часы»), Брея – Либавски, жидкофазного окисления бензальдегида и др. В рамках идеальной кинетики закона действующих масс автоколебания описываются только нелинейными механизмами, которые могут порождать неустойчивое протекание реакции. Целью проведенного исследования являлось изучение возможности описания автоколебаний в гомогенных химических реакциях, протекающих по линейным механизмам с неидеальной кинетикой. В ходе работы были использованы качественная теория обыкновенных дифференциальных уравнений и численные методы их решения. В результате рассмотрены гомогенные химические реакции, протекающие по неидеальному кинетическому закону Марселина – Де Донде в открытом изотермическом безградиентном реакторе по линейным стадийным схемам с участием трех и более реагентов. Показано, что в таких реакциях возможны автоколебания концентраций реагентов и скорости реакции различной периодичности и частоты. Для этих реакций построены математические модели, описывающие автоколебания, обусловленные отклонениями от идеальной кинетики закона действующих масс с учетом возможного взаимного влияния реагентов. Приведены примеры линейных стадийных схем-осцилляторов на основе классической модели колебательной химической реакции «брюсселятор» и реакции изомеризации бутенов. Предложено альтернативное объяснение возможных причин возникновения автоколебаний, основанное на нарушении устойчивых режимов протекания гомогенных реакций за счет неидеальности их кинетического закона, что позволяет описать автоколебания в таких реакциях линейными стадийными схемами.*

Ключевые слова: *автоколебания, гомогенные химические реакции, линейные стадийные схемы, кинетика Марселина – Де Донде, безградиентный реактор*

Благодарности. *Автор выражает благодарность кандидату химических наук, доценту В.Х. Федотову (Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары, Российская Федерация) за полезное обсуждение работы.*

Для цитирования: Кольцов Н.И. Автоколебания в гомогенных химических реакциях, протекающих по линейным стадийным схемам // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 150–157. DOI: 10.21285/achb.976. EDN: ABYFPO.

© Кольцов Н.И., 2025

CHEMICAL SCIENCES

Original article

Self-oscillations in homogeneous chemical reactions proceeding in a linear stepwise manner

Nikolay I. Kol'tsov

Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, Russian Federation

Abstract. *Oscillating chemical and biochemical reactions are of particular interest for understanding complex mechanisms underlying the evolution and self-organization of wildlife. Sustained oscillations (self-oscillations) are observed in a number of chemical and biological reactions: reactions of Belousov – Zhabotinsky ("bromate oscillators"), Briggs – Rauscher ("iodine clock"), Bray – Liebhafsky, liquid-phase oxidation of benzaldehyde, etc. In the ideal kinetics of the law of mass action, self-oscillations are described only by nonlinear mechanisms that can yield an unstable reaction. The present study aims to explore the possibility of describing self-oscillations in homogeneous chemical reactions proceeding according to linear mechanisms with nonideal kinetics. In the course of work, the qualitative theory of ordinary differential equations and numerical methods for their solution were used. The study considers homogeneous chemical reactions proceeding according to linear stepwise schemes with three or more reactants with nonideal Marcelin – de Donder kinetics in an open isothermal gradientless reactor. These reactions are shown to involve the self-oscillations of reactant concentrations and reaction rate, with varying periodicity and frequency. For these reactions, mathematical models were constructed to describe self-oscillations associated with deviations from the ideal kinetics of the law of mass action, taking the possible mutual influence of reactants into account. Examples are given of linear stepwise schemes based on the Brusselator, a classical model for chemical oscillations, and the butene isomerization reaction. An alternative explanation is proposed for the possible causes of self-oscillations: stable modes of homogeneous reactions are disrupted due to the nonideal kinetics, which enables the description of self-oscillations in such reactions by linear stepwise schemes.*

Keywords: *self-oscillations, homogeneous chemical reactions, linear stepwise schemes, Marcelin – de Donder kinetics, gradientless reactor*

Acknowledgements. *The author expresses gratitude to PhD, Associate Professor V.Kh. Fedotov (Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, Russian Federation) for useful discussion of the work.*

For citation: Kol'tsov N.I. Self-oscillations in homogeneous chemical reactions proceeding in a linear stepwise manner. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2):150-157. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.976. EDN: ABYFPO.

ВВЕДЕНИЕ

Фундаментальной проблемой теории самоорганизации является доказательство возможности возникновения сложного поведения неживой материи. Динамика химических и биохимических реакций вблизи термодинамического равновесия достаточно проста – монотонна. Вдали от равновесия возможны немонотонные явления – скачки (гистерезисы) и колебания концентраций реагентов и скорости реакции. Такие эффекты, как правило, обосновываются нелинейными механизмами [1–5].

Концентрационные колебания на базе идеальной кинетики закона действующих масс (ЗДМ) предсказаны А. Лотка и В. Вольтерра [6, 7]. Экспериментальное подтверждение колебаний в гомогенных реакциях началось с работ Б.П. Белоусова и А.М. Жаботинского [8–11]. Подробный анализ нелинейных процессов в химических и биологических системах приведен в монографиях [12, 13][1]. Автоколебания в реакциях, использующихся в химических процессах, исследованы, например, в источниках [14–17]. В работах [16, 17] описаны концентрационные колебания в реакциях окислительного карбонилирования непредельных соединений в условиях гомогенного металлокомплексного катализа. В статье [18] приведена неавтокаталитическая схема автоколебаний в растворах цианобактериальных белков. В публикации [19] исследована модель ферментативной реакции, в основу которой положена схема с бесконкурентным субстратным и конкурентным продуктным угнетением. Авторами работы [20] обнаружено периодическое возникновение сферических структур, согласованное с колебаниями физико-химических параметров жидкостей, связанное с фазовыми переходами воды из свободного в связанное состояние и обратно.

Особенности неидеальных кинетических законов исследовали Р. Марселин, Т. Де Донде и П. Ван Риссельберг [21–23]. Они сформировали принципы адекватного описания скорости элементарной реакции

[1] Imbihl R. Non-linear dynamics in catalytic reactions // Handbook of Surface Science / eds E. Hasselbrink, B.I. Lundqvist. Amsterdam: Elsevier, 2008. Vol. 3. P. 341–428. DOI: 10.1016/S1573-4331(08)00009-7.

(химические активности, химическое сродство, химические потенциалы и др.). Термодинамические ограничения на кинетическом законе Марселина – Де Донде исследовал А.Н. Горбань [24]. Бимолекулярная модель с кинетикой Марселина – Де Донде, описывающая колебания гликолитических промежуточных продуктов в дрожжевых клетках, предложена в источниках [26, 26]. Авторами статьи [26] выведено уравнение для расчета скорости реакции гидрокарбоксилирования 1-гексена, корректно описывающее эксперимент. В публикации [27] показана неприменимость термодинамики необратимых процессов к эволюции биологических систем. В обзоре [28] отмечено, что наличие нелинейных зависимостей приводит к тому, что скорость реакции не всегда пропорционально увеличивается с ростом активной поверхности катализатора из-за нарушения ЗДМ.

Приведенный выше обзор литературы показывает, что в настоящее время известны модели автоколебаний только для гомогенных процессов, протекающих по нелинейным стадийным схемам. Целью настоящей работы является исследование возможности описания автоколебаний и причин их возникновения в гомогенных химических реакциях, протекающих в открытой изотермической безградиентной системе по линейным механизмам с неидеальным кинетическим законом Марселина – Де Донде.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Механизм линейной гомогенной реакции состоит из стадий вида

$$A_j \leftrightarrow A_k, \qquad (1)$$

где Aj, A$_k$ – реагенты (исходные вещества и продукты реакции); $j \neq k = 1, ..., n \geq 2$ – номера реагентов. Динамика этой реакции в открытом безградиентном изотермическом реакторе (реакторе идеального смешения) описывается системой обыкновенных дифференциальных уравнений [2–5]:

$$A_j' = \sum_i r_i + q_0 A_{0j} - qA_j, \qquad (2)$$

где Aj = A$j(t)$ – концентрации реагентов; Aj' – производная по t, с$^{-1}$; t – время, с; i = 1, ..., s – номер стадии; $r_i(k_{+i},, k_{-i}, f_j)$ – скорости стадий для некоторого кинетического закона, с$^{-1}$; k_{+i}, k_{-i} – константы скоростей стадий в прямом и обратном направлениях, с$^{-1}$; f_j – кинетические функции неидеальности реагентов (в ЗДМ эти функции предполагаются линейными $f_j = A_j$); q_0, q – начальная и текущая скорости потока реакционной смеси в реакторе, с$^{-1}$; A_{0j} – начальные концентрации реагентов (начальные условия).

В стационарном состоянии A_j^∞ выполняются равенства

$$A_j' = 0, j = 1, \ldots, n. \qquad (3)$$

Пусть реакция (1) протекает по кинетическому закону Марселина – Де Донде [21–24]:

$$r_i = k_{+i} \exp(\mu_j) - k_{-i} \exp(\mu_k), \qquad (4)$$

$$\mu_j = \mu_{j0} + \ln f_j, \ \mu_k = \mu_{k0} + \ln f_k, \qquad (5)$$

где μ_j, μ_k – химические (с точностью до множителя) потенциалы реагентов; μ_{j0}, μ_{k0} – соответствующие начальные химические потенциалы (далее опущены). С учетом (4), (5) уравнения (2) запишутся так:

$$A_j' = \sum_i (k_{+i} f_j - k_{-i} f_k) + q_0 A_{0j} - qA_j. \qquad (6)$$

Достаточным условием возникновения автоколебаний для системы обыкновенных дифференциальных уравнений (6) является отсутствие достижимых из начальных условий устойчивых стационарных состояний. В неустойчивых стационарных состояниях матрица частных производных по концентрациям реагентов (матрица Якоби) для скоростей изменения концентраций реагентов

$$J \equiv (\partial A_j'/\partial A_k), j = 1, \ldots, n, k = 1, \ldots, n \qquad (7)$$

имеет собственное число λ с положительной действительной частью

$$\mathrm{Re}\ \lambda > 0. \qquad (8)$$

Достаточными условиями термодинамичности являются симметрия матрицы Якоби для химических потенциалов и неотрицательность ее главных миноров [24][2]:

$$M \equiv (\partial \mu_j/\partial A_k) = (\partial \mu_k/\partial A_j), j = 1, \ldots, n, k = 1, \ldots, n, \qquad (9)$$

$$g_j \equiv \det_p(M) \geq 0, \qquad (10)$$

где det – определитель; p = 1, ..., n – порядок определителя.

Покажем, что соотношения (7)–(10) могут быть выполнены для гомогенных реакций, протекающих в реакторе идеального смешения даже по линейным трехстадийным механизмам при учете взаимного влияния реагентов на их химические потенциалы (5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Последовательная реакция. Рассмотрим реакцию, протекающую последовательно через линейные стадии:

$$A \leftrightarrow B \leftrightarrow C \leftrightarrow D. \qquad (11)$$

К реакциям, протекающим по такой схеме, относятся, например, реакции изомеризации углеводородов с участием линейных изомеров бутена *транс*-$C_4H_8 \leftrightarrow$ *цис*-C_4H_8 или более длинные цепочки с участием нелинейных изомеров (2-метилпропен и циклобутан) и др. Некоторые из таких реакций могут протекать без участия катализаторов: термическая, фото- или радиационно-химическая изомеризация олефинов; медленная миграция двойной связи в олефине под действием света и g-излучения в присутствии сенсибилизаторов; изомеризация циклопарафинов с напряженным циклом под действием ультрафиолетовых лучей [29]. Аналогичные схемы могут быть частью ферментативных реакций, включающих различные превращения фермента – изомеризацию, иммобилизацию, ингибирование [18].

Запишем для схемы (12) уравнения (2):

$$\begin{aligned} A' &= -k_{+1}f_A + k_{-1}f_B + q_0A^0 - qA, \\ B' &= k_{+1}f_A - k_{-1}f_B - k_{+2}f_B + k_{-2}f_C + q_0B^0 - qB, \\ C' &= k_{+2}f_B - k_{-2}f_C - k_{+3}f_C + k_{-3}f_D + q_0C^0 - qC, \\ D' &= k_{+3}f_C - k_{-3}f_D + q_0D^0 - qD, \end{aligned} \qquad (12)$$

где k_{+1}, k_{-1}, k_{+2}, k_{-2}, k_{+3}, k_{-3} – константы скоростей стадий в прямом и обратном направлениях, с$^{-1}$, f_A, f_B, f_C, f_D – кинетические функции реагентов.

[2] Корн Г., Корн Т. Справочник по математике для научных работников и инженеров / под общ. ред. И.Г. Арамановича; пер. с англ. М.: Наука, 1973. 834 с.

В ЗДМ функции f_j линейны по концентрациям реагентов и стационарное состояние системы (12) единственно и устойчиво, а колебания невозможны. В кинетике Марселина – Де Донде все или часть функций fj могут быть нелинейными по концентрациям реагентов, но не произвольными (должны удовлетворять термодинамическим ограничениям). Пусть для реакции, протекающей по схеме (11), кинетические функции веществ A и C нелинейные (отличаются от ЗДМ), а для B и D – линейные (совпадают с ЗДМ):

$$f_A = A^{\alpha}(1 - B - C)^{\gamma},\ f_B = B,\ f_C = CA^{\beta},\ f_D = D, \qquad (13)$$

где α, β, $\gamma \geq 0$ – параметры (константы) неидеальности (при $\alpha = 1$, $\beta = 0$, $\gamma = 0$ эти функции совпадают с ЗДМ).

Это означает, что на скорость образования – расходования исходного вещества A влияют и продукты B и C, а на кинетику продукта C влияет исходное вещество A, то есть имеет место своеобразный кинетический (не молекулярный) автокатализ. Тогда модель (12) примет вид

$$\begin{aligned} A' &= -k_{+1}A^{\alpha}(1 - B - C)^{\gamma} + k_{-1}B + q_0A^0 - qA, \\ B' &= k_{+1}A^{\alpha}(1 - B - C)^{\gamma} - k_{-1}B - k_{+2}B + k_{-2}CA^{\beta} + \\ &\quad + q_0B^0 - qB, \\ C' &= k_{+2}B - k_{-2}CA^{\beta} - k_{+3}CA^{\beta} + k_{-3}D + q_0C^0 - qC, \\ D' &= k_{+3}CA^{\beta} - k_{-3}D + q_0D^0 - qD. \end{aligned} \qquad (14)$$

Численный анализ этой системы проводился с помощью стандартных модулей решения обыкновенных дифференциальных уравнений (ode45 – метода Рунге-Кутта, пакета МАТЛАБ (версия 7.2.0.232)). Шаг интегрирования = 0,1, точность вычислений = 10-3 (0,1%). Результаты перепроверены методом Адамса и др. (ODE113). Для построения двумерных фазовых портретов использована команда PLOT с опцией options=odeset('RelTol',1.e-3,'OutputFcn',@odephas2).

Анализ показал, что при $\alpha = 0$, $\beta = 2$, $\gamma = 1$ (минимальные значения параметров неидеальности) модель (13) характеризуется единственным неустойчивым стационарным состоянием. Это в сочетании с неустойчивой внешней границей области осуществления реакции приводит к выполнению достаточных условий автоколебаний (7), (8) при $k_{+1} \in [2–4]$, $k_{-1} << 1$, $k_{+2} << 1$, $k_{-2} < 1$, $k_{+3} >> 1$, $k_{-3} < 1$, $q_0 = q \in [0{,}005–0{,}025]$, $\alpha << 1$, $\beta \in [1{,}8–2{,}2]$, $\gamma \in [0{,}5–1{,}5]$. При малых $\beta < 1{,}5$ изменения концентраций веществ во времени для реакции (11) монотонны (стационарное состояние – устойчивый узел). С ростом β вначале возникают затухающие колебания (стационарное состояние – устойчивый фокус). При дальнейшем росте $\beta > 1{,}7$ начинаются периодические релаксационные автоколебания (мягкое рождение) малой амплитуды (стационарное состояние – неустойчивый фокус). С дальнейшим ростом β до 2,2 амплитуда автоколебаний растет. При $\beta > 2{,}2$ колебания исчезают (стационарное состояние вновь становится устойчивым узлом). На рис. 1 и 2 приведены результаты численных расчетов модели (14), иллюстрирующие автоколебания в реакции (11) (устойчивые колебания в данном случае – это колебания, сохраняющиеся как угодно долго с течением времени; затухающие колебания – устойчивые колебания с бесконечно уменьшающейся со временем амплитудой; релаксационные колебания – устойчивые колебания с чередованием во времени медленных и быстрых участков движения).

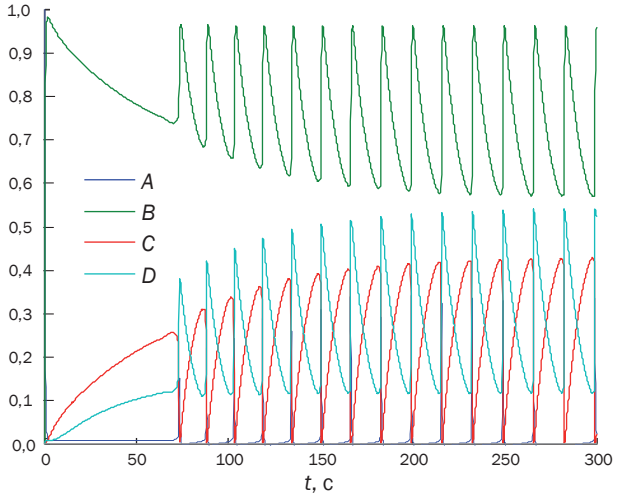


Рис. 1. Динамика концентраций реагентов реакции (11) при $A^0 = 1$, $B^0 = C^0 = D^0 = 0$, $k_{+1} = 3$, $k_{-1} = 0{,}01$, $k_{+2} = 0{,}01$, $k_{-2} = 0{,}1$, $k_{+3} = 1000$, $k_{-3} = 0{,}1$, $q = q_0 = 0{,}01$, $\alpha = 0$, $\beta = 2$, $\gamma = 1$

Fig. 1. Dynamics of concentrations of reactants reaction (11) at $A^0 = 1$, $B^0 = C^0 = D^0 = 0$, $k_{+1} = 3$, $k_{-1} = 0.01$, $k_{+2} = 0.01$, $k_{-2} = 0.1$, $k_{+3} = 1000$, $k_{-3} = 0.1$, $q = q_0 = 0.01$, $\alpha = 0$, $\beta = 2$, $\gamma = 1$

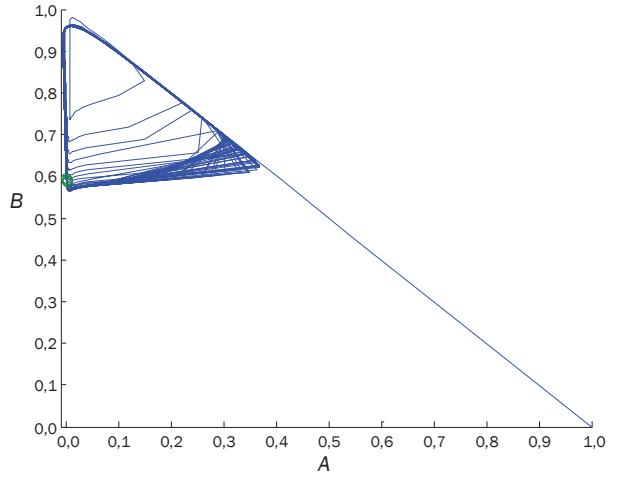


Рис. 2. Фазовый портрет реакции (11) на плоскости (A, B) при $A^0 = 1$, $B^0 = C^0 = D^0 = 0$, $k_{+1} = 3$, $k_{-1} = 0{,}01$, $k_{+2} = 0{,}01$, $k_{-2} = 0{,}1$, $k_{+3} = 1000$, $k_{-3} = 0{,}1$, $q = q_0 = 0{,}01$, $\alpha = 0$, $\beta = 2$, $\gamma = 1$

Fig. 2. Phase portrait of reaction (11) on the plane (A, B) at $A^0 = 1$, $B^0 = C^0 = D^0 = 0$, $k_{+1} = 3$, $k_{-1} = 0.01$, $k_{+2} = 0.01$, $k_{-2} = 0.1$, $k_{+3} = 1000$, $k_{-3} = 0.1$, $q = q_0 = 0.01$, $\alpha = 0$, $\beta = 2$, $\gamma = 1$

Из приведенных рисунков видно, что в режиме автоколебаний концентрация исходного реагента A резко падает в начале реакции и остается очень малой (за исключением периодических всплесков) в течение всей реакции. При этом концентрации промежуточных веществ B, C и продукта D быстро возрастают и переходят в режим релаксационных колебаний с нарастающей амплитудой вокруг единственного неустойчивого стационарного состояния типа фокус с координатами $A \approx 0{,}0056$, $B \approx 0{,}5591$, $C \approx 0{,}4353$, $D \approx 0{,}1237$. Окончательная стабилизация колебаний наступает после $t \approx 250$ с. Основной причиной незатухающих колебаний является

протекание реакции в условиях дефицита исходного вещества A, обусловленного малыми и равными начальными и текущими скоростями входного потока (слабооткрытая или квазиоткрытая система). Релаксационный характер колебаний обусловлен неравномерным изменением концентраций веществ вблизи стационарного состояния: при приближении к нему концентрации меняются медленно и плавно, а при удалении – быстро и резко.

Рассмотрим пример. «Брюсселятор» – классическая модель колебательной химической реакции A = D, традиционно описывается автокаталитической схемой [1, 3, 30]:

$$\begin{aligned} &1)\ A \to X, \quad 2)\ B + X \to Y + C, \\ &3)\ 2X + Y \to 3X, \quad 4)\ X \to D, \end{aligned} \tag{15}$$

где X, Y, B и C – промежуточные вещества.

Модифицируем эту схему, считая концентрации B и C постоянными: исключим автокатализ и объединим две последних стадии, получим 1) A → X, 2) X → Y, 3-4) Y → D. Переобозначив X и Y на B и C соответственно, приходим к рассмотренной выше схеме (11). В связи с этим все свойства модели (12)–(14) применимы к «брюсселятору» и автоколебания возможны и тогда, когда та же реакция протекает по линейной стадийной схеме и нелинейному кинетическому закону Марселина – Де Донде, учитывающему возможное взаимное влияние реагентов на химические потенциалы промежуточного реагента X и продукта реакции D.

Циклическая реакция. Рассмотрим реакцию, протекающую по циклической линейной стадийной схеме

$$A \leftrightarrow B \leftrightarrow C \leftrightarrow A. \tag{16}$$

Примерами таких реакций являются: изомеризация углеводородов [3]; клеточное дыхание – ферментативное разложение органических веществ (глюкозы) в клетке до CO_2 и H_2O в присутствии O_2 с выделением энергии[3].

Запишем для реакции (16) кинетическую модель в реакторе идеального смешения:

$$\begin{aligned} A' &= -k_{+1}f_A + k_{-1}f_B + k_{+3}f_C - k_{-3}f_A + q_0A^0 - qA, \\ B' &= k_{+1}f_A - k_{-1}f_B - k_{+2}f_B + k_{-2}f_C + q_0B^0 - qB, \\ C' &= k_{+2}f_B - k_{-2}f_C - k_{+3}f_C + k_{-3}f_A + q_0C^0 - qC. \end{aligned} \tag{17}$$

Зададим аналогично (13) кинетические функции

$$f_A = A^\alpha(1 - B - C)^\gamma,\ f_B = B,\ f_C = CA^\beta, \tag{18}$$

при которых динамическая модель (17) принимает вид

$$\begin{aligned} A' &= -k_{+1}A^\alpha(1 - B - C)^\gamma + k_{-1}B + k_{+3}CA^\beta - \\ &\quad - k_{-3}A^\alpha(1 - B - C)^\gamma + q_0A^0 - qA, \\ B' &= k_{+1}A^\alpha(1 - B - C)^\gamma - k_{-1}B - k_{+2}B + k_{-2}CA^\beta + \\ &\quad + q_0B^0 - qB, \\ C' &= k_{+2}B - k_{-2}CA^\beta - k_{+3}CA^\beta + k_{-3}A^\alpha(1 - B - C)^\gamma + \\ &\quad + q_0C^0 - qC. \end{aligned} \tag{19}$$

Анализ показал, что в этой модели достаточные условия автоколебаний (8) выполняются при $k_{+1} \approx 3$, $k_{-1}, k_{+2}, k_{-2}, k_{-3} << 1$, $k_{+3} >> 1$, $q_0 = q << 1$, $\alpha << 1$, $\beta \approx 2$, $\gamma \approx 1$. Численная иллюстрация решения модели (19) приведена на рис. 3 и 4.

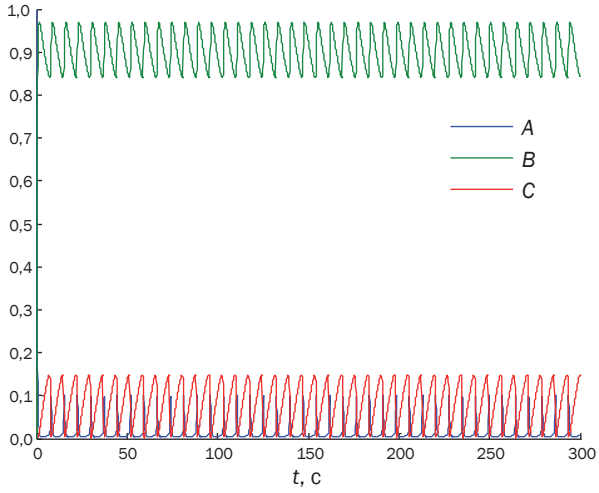


Рис. 3. Динамика концентраций реагентов реакции (16) при $A^0 = 1$, $B^0 = C^0 = 0$, $k_{+1} = 3$, $k_{-1} = 0{,}001$, $k_{+2} = 0{,}034$, $k_{-2} = 0$, $k_{+3} = 2000$, $k_{-3} = 0$, $q_0 = q = 0{,}009$, $\alpha = 0{,}05$, $\beta = 2$, $\gamma = 1$

Fig. 3. Dynamics of concentrations of reactants reaction (16) at $A^0 = 1$, $B^0 = C^0 = 0$, $k_{+1} = 3$, $k_{-1} = 0.001$, $k_{+2} = 0.034$, $k_{-2} = 0$, $k_{+3} = 2000$, $k_{-3} = 0$, $q_0 = q = 0.009$, $\alpha = 0.05$, $\beta = 2$, $\gamma = 1$

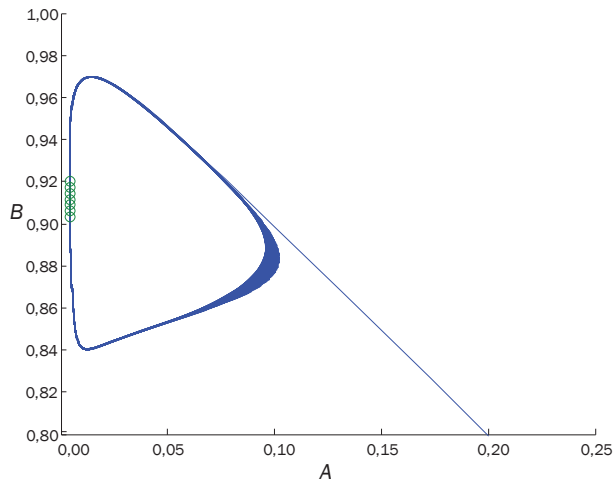


Рис. 4. Фазовый портрет реакции (16) на плоскости (A, B) при $A^0 = 1$, $B^0 = C^0 = 0$, $k_{+1} = 3$, $k_{-1} = 0{,}001$, $k_{+2} = 0{,}034$, $k_{-2} = 0$, $k_{+3} = 2000$, $k_{-3} = 0$, $q_0 = q = 0{,}009$, $\alpha = 0{,}05$, $\beta = 2$, $\gamma = 1$

Fig. 4. Phase portrait of reaction (16) on the plane (A, B) at $A^0 = 1$, $B^0 = C^0 = 0$, $k_{+1} = 3$, $k_{-1} = 0.001$, $k_{+2} = 0.034$, $k_{-2} = 0$, $k_{+3} = 2000$, $k_{-3} = 0$, $q_0 = q = 0.009$, $\alpha = 0.05$, $\beta = 2$, $\gamma = 1$

Рассмотрим пример. Возможность автоколебаний в реакции превращения трех изомеров бутен-1 ↔ *цис*-бутен-2 ↔ *транс*-бутен-2 ↔ бутен-1 показана в источнике [31]. В связи с этим свойства модели (16)–(19) применимы к этой реакции с кинетикой Марселина – Де Донде, учитывающей взаимное влияние реагентов.

Отметим, что матрицы Якоби для химических потенциалов кинетических функций (13) и (18) неотрицательно определены, то есть условие (10) выполнено. При этом условие (9) не выполняется, но оно не является необ-

[3] Тимин О.А. Лекции по общей биохимии для студентов медицинских вузов. 2020. 362 с.

ходимым и кинетические функции не противоречат термодинамическим ограничениям.

Идеальный закон действующих масс выполняется для элементарных реакций при малых концентрациях исходных реагентов, что наблюдается в конце их осуществления. Применение этого закона на все время протекания реакции приводит заведомо к приближенному описанию ее кинетических закономерностей. Рассмотренная в работе неидеальная модель Марселина – Де Донде позволяет адекватно описать кинетические закономерности реакции на всем временном интервале ее осуществления. Это имеет важное практическое значение для установления кинетических моделей, детально описывающих особенности протекания реакций в различных, в том числе автоколебательных режимах, а также использования этих моделей для управления и оптимизации химических процессов. Ограничением в использовании модели Марселина – Де Донде является выбор кинетических функций по концентрациям реагентов, при котором эти функции должны удовлетворять определенным термодинамическим ограничениям и не должны быть произвольными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что в гомогенных химических реакция с неидеальным кинетическим законом Марселина – Де Донде, протекающих в открытом изотермическом безградиентном реакторе по последовательной или циклической линейной стадийной схеме с участием трех и более реагентов, возможны автоколебания кинетической природы. При этом неидеальность кинетического закона выполняет роль обратной связи, аналогичной автокатализу для реакций с идеальным кинетическим законом действующих масс.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Николис Г., Пригожин И. Самоорганизация в неравновесных системах: от диссипативных структур к упорядоченности через флуктуации / пер. с англ. М.: Мир, 1979. 512 с.

2. Вольтер Б.В., Сальников И.Е. Устойчивость работы химических реакторов. М: Химия, 1981. 192 с.

3. Яблонский Г.С, Быков В.И., Горбань А.Н. Кинетические модели каталитических реакций / отв. ред. А.А. Иванов. Новосибирск: Наука, 1983. 253 с.

4. Быков В.И., Цыбенова С.Б. Нелинейные модели химической кинетики. М.: URSS, КРАСАНД, 2011. 396 с.

5. Быков В.И. Моделирование критических явлений в химической кинетике. М.: URSS, 2014. 328 с.

6. Lotka A.J. Contribution to the theory of periodic reaction // The Journal of Physical Chemistry. 1910. Vol. 14, no. 3. P. 271–274. DOI: 10.1021/j150111a004.

7. Вольтерра В. Математическая теория борьбы за существование / пер. с франц. М.: Наука, 1976. 286 с.

8. Белоусов Б.П. Периодически действующая реакция и ее механизм // Автоволновые процессы в системах с диффузией / отв. ред. М.Т. Грехова. Горький: Изд-во ИПФ АН СССР, 1981. С. 176–186.

9. Жаботинский А.М. Концентрационные автоколебания. М.: Наука, 1974. 178 с.

10. Корзухин М.Д., Жаботинский А.М. Математическое моделирование химических и экологических автоколебательных систем. М.: Наука, 1965. 440 с.

11. Колебания и бегущие волны в химических системах / ред. Р. Филд, М. Бургер; пер. с англ. М.: Мир, 1988. 720 с.

12. Гарел Д., Гарел О. Колебательные химические реакции / пер. с англ. М.: Мир, 1986. 148 с.

13. Epstein I.R., Pojman J.A. An introduction to nonlinear chemical dynamics: oscillations, waves, patterns, and chaos. New York, Oxford: Oxford University Press, 1998. 408 p.

14. Братусь А.С., Новожилов А.С., Платонов А.П. Динамические системы и модели биологии. М.: Физматлит, 2010. 400 с.

15. Куркина Е.С. Автоколебания, структуры и волны в химических системах. Методы математического моделирования. М.: Изд-во РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2012. 220 с.

16. Городский С.Н., Новакович К. Концентрационные автоколебания в процессах окислительного карбонилирования непредельных соединений. 1. Процессы окислительного карбонилирования ацетилена и фенилацетилена // Вестник МИТХТ им. М.В. Ломоносова. 2011. Т. 6. N 4. С. 3–19. EDN: OILYTX.

17. Городский С.Н. Концентрационные автоколебания в процессах окислительного карбонилирования непредельных соединений. 2. Окислительное карбонилирование алкинов в растворах галогенидных комплексов палладия // Вестник МИТХТ им. М.В. Ломоносова. 2011. Т. 6. N 6. С. 3–18. EDN: OODHRJ.

18. Bayramov Sh.K. Mathematical model of self-oscillations of activity of Kai proteins // Biochemistry (Moscow). 2016. Vol. 81. P. 284–288. DOI: 10.1134/S0006297916030111.

19. Москалейчик Ф.Ф. Исследование кинетической модели ферментативной реакции с субстратным и продуктным ингибированием. Концентрационные автоколебания как возможная причина сверхдоминантных взаимодействий аллозимных генов // Успехи современной биологии. 2009. Т. 129. N 5. С. 454–463. EDN: LLUCTV.

20. Яхно Т.А., Яхно В.Г., Занозина В.Ф. Фазовые переходы воды как источник медленных колебательных процессов в жидких средах // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2017. Т. 2. N 1. С. 23–27. EDN: XDNASO.

21. Marcelin R. Contribution à l'étude de la cinétique physico-chimique // Annales de Physique. 1915. Vol. 9, ch. 3. P. 120–231. DOI: 10.1051/anphys/191509030120.

22. Van Rysselberghe P. Reaction rates and affinities // Journal of Chemical Physics. 1958. Vol. 29, no. 3. P. 640–642. DOI: 10.1063/1.1744552.

23. Де-Донде Т., Ван Риссельберг П. Термодинамическая теория сродства (книга принципов) / пер. с англ. М.: Металлургия, 1984. 136 с.

24. Горбань А.Н. Обход равновесия (уравнения химической кинетики и их термодинамический анализ) / отв. ред. Г. С. Яблонский. Новосибирск: Наука, 1984. 226 с.

25. Higgins J. A chemical mechanism for oscillation of glycolytic intermediates in yeast cells // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1964. Vol. 51, no. 6. P. 989–994. DOI: 10.1073/pnas.51.6.989.

26. Vigranenko Yu.T., de Vekki A.V., Krylova T.E., Koluzhnikova E.V. Describing the reaction of the hydrocarboxylation of 1-hexene, catalyzed by $Co_2(CO)_8$, in Marcelin – de Donde kinetics // Russian Journal of Physical Chemistry A. 2020. Vol. 94. P. 2209–2211. DOI: 10.1134/S0036024420110321.

27. Эткин В.А. Эргодинамическая теория эволюции биологических систем // Информационные процессы, системы и технологии. 2022. Т. 3. N 1. С. 12–24. DOI: 10.52529/27821617_2022_3_1_12. EDN: MFNAHW.

28. Slinko M.M., Makeev A.G. Heterogeneous catalysis and nonlinear dynamics // Kinetics and Catalysis. 2020. Vol. 61, no. 4. P. 495–515. DOI: 10.1134/S0023158420040114.

29. Жоров Ю.М. Изомеризация углеводородов: химия и технология. М.: Химия, 1983. 301 с.

30. Sanayei A. Controlling chaotic forced brusselator chemical reaction // Proceedings of the World Congress on Engineering (London, 30 June – 2 July 2010). London, 2010. Vol. 3. P. 1–6.

31. Bak T.A. Contributions to the theory of chemical kinetics: a study of the connection between thermodynamics and chemical rate processes. New York: W.A. Benjamin Inc., 1963. 112 p.

REFERENCES

1. Nicolis G., Prigogine I. Self-organization in nonequilibrium systems: from dissipative structures to order through fluctuations; 1977, 471 p. (Russ. ed.: *Samoorganizatsiya v neravnovesnykh sistemakh: ot dissipativnykh struktur k uporyadochennosti cherez fluktuatsii*. Moscow: Mir; 1979, 512 p.).

2. Vol'ter B.V., Sal'nikov I.E. *Stability of chemical reactors*. Moscow: Chemistry; 1981, 192 p. (In Russian).

3. Yablonskii G.S, Bykov V.I., Gorban' A.N. *Kinetic models of catalytic reactions*. Novosibirsk: Nauka; 1983, 254 p. (In Russian).

4. Bykov V.I., Tsybenova S.B. *Nonlinear models of chemical kinetics*. Moscow: URSS, KRASAND; 2011, 400 p. (In Russian).

5. Bykov V.I. *Modeling of critical phenomena in chemical kinetics*. Moscow: URSS; 2014, 328 p. (In Russian).

6. Lotka A.J. Contribution to the theory of periodic reaction. *The Journal of Physical Chemistry*. 1910;14(3):271-274. DOI: 10.1021/j150111a004.

7. Volterra V. Mathematical theory of the struggle for existence; 1931, 228 p. (Russ. ed.: *Matematicheskaya teoriya bor'by za sushchestvovanie*. Moscow: Nauka; 1976, 286 p.).

8. Belousov B.P. Periodic reaction and its mechanism. In: Grekhova M.T. (ed.). *Autowave processes in systems with diffusion*. Gorky: Institute of Applied Physics, Academy of Sciences of the Union of Soviet Socialist Republics; 1981, p. 176-186. (In Russian).

9. Zhabotinskii A.M. *Concentration self-oscillations*. Moscow: Nauka; 1974, 178 p. (In Russian).

10. Korzukhin M.D., Zhabotinskii A.M. *Mathematical modeling of chemical and ecological self-oscillating systems*. Moscow: Nauka; 1965, 440 p. (In Russian).

11. Field R.J., Burger M. Oscillations and traveling waves in chemical systems; 1985, 712 p. (Russ. ed.: *Kolebaniya i begushchie volny v khimicheskikh sistemakh*. Moscow: Mir; 1988, 720 p.).

12. Gurel D., Gurel O. Oscillations in chemical reactions; 1983, 147 p. (Russ. ed.: *Kolebatel'nye khimicheskie reaktsii*. Moscow: Mir; 1986, 148 p.).

13. Epstein I.R., Pojman J.A. *An introduction to nonlinear chemical dynamics: oscillations, waves, patterns, and chaos*. New York, Oxford: Oxford University Press; 1998, 408 p.

14. Bratus' A.S., Novozhilov A.S., Platonov A.P. *Dynamic systems and models of biology*. Moscow: Fizmatlit; 2011, 400 p. (In Russian).

15. Kurkina E.S. *Self-oscillations, structures and waves in chemical systems. Methods of mathematical modeling*. Moscow: Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia; 2012, 220 p. (In Russian).

16. Gorodskii S.N., Novakovich K. Concentration self-oscillations in the processes of oxidative carbonylation of unsaturated compounds. 1. Processes of oxidative carbonylation of acetylene and phenylacetylene. *Vestnik MITKhT im. M.V. Lomonosova*. 2011;6(4):3-19. (In Russian). EDN: OILYTX.

17. Gorodskii S.N. Concentration self-oscillations in the processes of oxidative carbonylation of unsaturated compounds. 2. Oxidative carbonylation of alkynes in solutions of palladium halide complexes. *Vestnik MITKhT im. M.V. Lomonosova*. 2011;6(6):3-18. (In Russian). EDN: OODHRJ.

18. Bayramov Sh.K. Mathematical model of self-oscillations of activity of Kai proteins. *Biochemistry (Moscow)*. 2016;81:284-288. DOI: 10.1134/S0006297916030111.

19. Moskaleichik F.F. Analysis of a kinetic model of substrate- and product-inhibited enzyme reaction. self-oscillations as a possible cause of overdominant interactions of allozyme genes. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2009;129(5):454-463. (In Russian). EDN: LLUCTV.

20. Yakhno T.A., Yakhno V.G., Zanozina V.F. Phase transitions of water as a source of slow oscillatory processes in liquid media. *Russian Journal of Biological Physics and Chemisrty*. 2017;2(1):23-27. (In Russian). EDN: XDNASO.

21. Marcelin R. Contribution à l'étude de la cinétique physico-chimique. *Annales de Physique*. 1915;9(3):120-231. DOI: 10.1051/anphys/191509030120.

22. Van Rysselberghe P. Reaction rates and affinities. *Journal of Chemical Physics*. 1958;29(3):640-642. DOI: 10.1063/1.1744552.

23. De Donder Th., Van Rysselberghe P. Thermodynamic theory of affinity: a book of principles; 1936, 142 p. (Russ. ed.: T*ermodinamicheskaya teoriya srodstva (kniga printsipov)*. Moscow: Mir; 1984, 136 p.).

24. Gorban' A.N. *Bypassing equilibrium (equations of chemical kinetics and their thermodynamic analysis)*. Novosibirsk: Nauka; 1984, 226 p. (In Russian).

25. Higgins J. A chemical mechanism for oscillation of glycolytic intermediates in yeast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1964;51(6):989-994. DOI: 10.1073/pnas.51.6.989.

26. Vigranenko Yu.T., de Vekki A.V., Krylova T.E., Koluzhnikova E.V. Describing the reaction of the hydrocarboxylation of 1-hexene, catalyzed by $Co_2(CO)_8$, in Marcelin – de Donde kinetics. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2020;94:2209-2211. DOI: 10.1134/S0036024420110321.

27. Etkin V.A. Ergodynamic theory of biological systems evolution. *Information Processes, Systems and Technologies.* 2022;3(1):12-24. (In Russian). DOI: 10.52529/27821617_2022_3_1_12. EDN: MFNAHW.

28. Slinko M.M., Makeev A.G. Heterogeneous catalysis and nonlinear dynamics. *Kinetics and Catalysis*. 2020;61(4):495-515. DOI: 10.1134/S0023158420040114.

29. Zhorov Yu.M. *Isomerization of hydrocarbons: chemistry and technology*. Moscow: Chemistry; 1983, 301 p. (In Russian).

30. Sanayei A. Controlling chaotic forced brusselator chemical reaction. In: *Proceedings of the World Congress on Engineering.* 30 June – 2 July 2010, London. London; 2010, vol. 3, p. 1-6.

31. Bak T.A. *Contributions to the theory of chemical kinetics: a study of the connection between thermodynamics and chemical rate processes*. New York: W.A. Benjamin Inc.; 1963, 112 p.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Кольцов Николай Иванович,
д.х.н., профессор, заведующий кафедрой,
Чувашский государственный
университет им. И.Н. Ульянова,
428034, г. Чебоксары, Московский пр., 15,
Российская Федерация,
koltsovni@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-2264-1370

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 17.01.2025.
Одобрена после рецензирования 01.03.2025.
Принята к публикации 31.05.2025.

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Nikolay I. Kol'tsov,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Head of the Department,
Chuvash State University
named after I.N. Ulyanov,
15, Moskovskiy Ave., Cheboksary, 428034,
Russian Federation,
koltsovni@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-2264-1370

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 of interest

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

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

Information about the article

The article was submitted 17.01.2025.
Approved after reviewing 01.03.2025.
Accepted for publication 31.05.2025.

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

Научная статья
УДК 544.2: 546.273
EDN: GKTMGL
DOI: 10.21285/achb.974

Фазообразование в тройных системах оксидов натрия, редкоземельного металла (скандия, индия, иттербия) и бора

А.К. Субанаков*,✉, Е.В. Ковтунец*, А.Н. Соболев**, А.С. Танхаева*****

**Байкальский институт природопользования СО РАН, Улан-Удэ, Российская Федерация*
***Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова, Улан-Удэ, Российская Федерация*
****АО «Хиагда», Багдарин, Российская Федерация*

Аннотация. *Целью проведенного исследования являлось изучение фазовых равновесий в системах Na_2O–R_2O_3–B_2O_3 (R = In, Sc, Yb). Взаимодействия в системах изучались методом твердофазных реакций. Впервые изучено фазообразование в тройных системах оксидов натрия, редкоземельного металла (скандия, индия, иттербия) и бора в субсолидусной области в интервале температур 700–750 °С. Построены предварительные триангуляции изученных систем. Изотермические сечения систем Na_2O–R_2O_3–B_2O_3 (R = In, Sc, Yb) при 750 °С представлены восемью, тринадцатью и одиннадцатью треугольниками сосуществующих фаз соответственно. В ходе работы в системе Na_2O–Sc_2O_3–B_2O_3 нами подтверждено образование трех известных двойных боратов натрия-скандия следующих составов: $Na_3Sc(BO_3)_2$, $Na_3Sc_2(BO_3)_3$, $NaScB_2O_5$. Установлено образование двойного бората натрия-скандия ориентировочного состава $Na_3ScB_8O_{15}$, которое проиндицировалось в моноклинной сингонии (ориентировочная пространственная группа симметрии Cc). Уточнение параметров элементарной ячейки проведено методом Ле-Бейля: a = 12,625(6), b = 7,725(2), c = 10,409(3), β = 53,19(2)°. Система Na_2O–Yb_2O_3–B_2O_3 содержит три новых двойных бората: составов $Na_3Yb(BO_3)_2$, $Na_3YbB_8O_{15}$ и состава, близкого к стехиометрическому соотношению $Na_2O•Yb_2O_3•B_2O_3$. Впервые экспериментально показано образование соединений: $Na_3YbB_8O_{15}$ изоструктурного $Na_3GdB_8O_{15}$ и $Na_3Yb(BO_3)_2$ изоформульного, но не изоструктурного $Na_3Y(BO_3)_2$. Тройная оксидная система с индием оказалась эвтектичной, то есть без образования двойных боратов натрия-индия.*

Ключевые слова: *тройные оксидные системы, двойные бораты натрия и редкоземельных металлов, твердофазный синтез, рентгенофазовый анализ, автоиндицирование*

Благодарности. *Исследования выполнены с использованием ресурсов Центра коллективного пользования исследовательского оборудования Байкальского института природопользования СО РАН (г. Улан-Удэ, Россия).*

Финансирование. *Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 23-23-00451).*

Для цитирования: Субанаков А.К., Ковтунец Е.В., Соболев А.Н., Танхаева А.С. Фазообразование в тройных системах оксидов натрия, редкоземельного металла (скандия, индия, иттербия) и бора // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 158–166. DOI: 10.21285/achb.974. EDN: GKTMGL.

© Субанаков А.К., Ковтунец Е.В., Соболев А.Н., Танхаева А.С., 2025

CHEMICAL SCIENCES

Original article

Phase formation in ternary systems of sodium, rare-earth (scandium, indium, and ytterbium), and boron oxides

Alexey K. Subanakov*,✉, Evgeniy V. Kovtunets*, Andrey N. Sobolev**, Altana S. Tankhaeva*****

**Baikal Institute of Nature Management, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Russian Federation*
***Banzarov Buryat State University, Ulan-Ude, Russian Federation*
****AO Khiagda, Bagdarin, Russian Federation*

Abstract. *The study was aimed at examining phase equilibria in $Na_2O–R_2O_3–B_2O_3$ systems (R = In, Sc, Yb). Interactions in these systems were analyzed using the solid-state reaction method. Phase formation in the ternary systems of sodium, rare-earth (scandium, indium, and ytterbium), and boron oxides was studied for the first time in the subsolidus region within the temperature range of 700–750°C. Preliminary triangulation of the analyzed systems was conducted. At 750°C, the isothermal cross sections of $Na_2O–R_2O_3–B_2O_3$ (R = In, Sc, Yb) systems are represented by eight, thirteen, and eleven triangles of coexisting phases, respectively. The study confirmed the formation of three known double sodium-scandium borates in the $Na_2O–Sc_2O_3–B_2O_3$ system: $Na_3Sc(BO_3)_2$, $Na_3Sc_2(BO_3)_3$, and $NaScB_2O_5$. Also, a double sodium-scandium borate of approximate composition $Na_3ScB_8O_{15}$ was found to form, which was indexed as monoclinic (approximate space symmetry group Cc). The unit cell parameters were refined using the Le Bail method: a = 12.625(6); b = 7.725(2); c = 10.409(3), β = 53.19(2)°. The $Na_2O–Yb_2O_3–B_2O_3$ system contains three new double borates: $Na_3Yb(BO_3)_2$, $Na_3YbB_8O_{15}$, and borate with a composition close to the stoichiometric ratio $Na_2O•Yb_2O_3•B_2O_3$. The formation of the following compounds was first experimentally shown: $Na_3YbB_8O_{15}$ isostructural to $Na_3GdB_8O_{15}$ and isoformula $Na_3Yb(BO_3)_2$, which is not isostructural to $Na_3Y(BO_3)_2$. The triple oxide system with indium was found to be eutectic, i.e., without the formation of double sodium-indium borates.*

Keywords: *ternary oxide systems, double borates of sodium and rare-earth elements, solid-phase synthesis, X-ray diffraction analysis, auto-indexing*

Acknowledgment. *The research was carried out using the resources of the Research Equipment Sharing Center of Baikal Institute of Nature Management, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Ulan-Ude, Russian Federation).*

Funding. *The Russian Science Foundation financially supported the work (grant no. 23-23-00451).*

For citation: Subanakov A.K., Kovtunets E.V., Sobolev A.N., Tankhaeva A.S. Phase formation in ternary systems of sodium, rare-earth (scandium, indium, and ytterbium), and boron oxides. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2):158-166. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.974. EDN: GKTMGL.

ВВЕДЕНИЕ

Научно-технологический прогресс задает новые требования к материалам, обладающим функциональными свойствами. В связи с этим постоянно ведется работа по модификации известных и поиску новых функциональных материалов. Среди них особое место занимают материалы на основе сложнооксидных соединений, которые, благодаря стабильности, структурному разнообразию и высокой степени изученности, широко используются в наукоемких отраслях современного производства.

Бораты представляют собой перспективные объекты исследований в области фотоники и ионики твердого тела [1–6] благодаря ряду преимуществ, таких как: 1) структурное разнообразие, обусловленное возможностью полимеризации и поликонденсации боратных группировок (BO^{3-} и BO^{4-}); 2) высокая область прозрачности, позволяющая эффективно использовать их в оптических приложениях; 3) невысокие температуры синтеза, что упрощает и удешевляет процесс получения материалов; 4) относительно дешевые исходные вещества, которые доступны для широкого круга исследователей. Двойные бораты натрия и редкоземельных элементов представляют как научный, так и практический интерес в качестве люминофоров, нелинейно-оптических и двулучепреломляющих материалов и твердых электролитов. Согласно проведенному литературному обзору, выявлены следующие семейства двойных боратов: $Na_3R(BO_3)_2$ (*R* = La, Pr–Gd, Y, Sc) [7–11], $NaScB_2O_5$ [12], $Na_3GaB_4O_9$ [13], $Na_3R_2(BO_3)_3$ (*R* = La, Nd, Sm, Gd, Sc) [8, 14, 15], $Na_2R_2B_2O_7$ (R = La, Nd–Tb, Y, Ga, Al) [16–22], $Na_3Y_3(BO_3)_4$ [23], $Na_3R_9B_8O_{27}$ (*R* = La, Nd, Y) [24–26], $Na_3RB_8O_{15}$ (*R* = Eu, Gd, Al) [27–29]

(табл. 1.). В связи с открытием плеяды нелинейно-оптических боратов наибольший интерес представляют нецентросимметричные соединения: $Na_3R_2(BO_3)_3$, $Na_3R_9B_8O_{27}$ и недавно открытый двойной борат $Na_3Y_3(BO_3)_4$, в то время как центросимметричные фазы исследуются в качестве люминофоров. В последние годы установлено образование соединений $Na_3RB_8O_{15}$ [27–29] со сложной боратной группировкой B_8O_{15} (5Δ3T:<2ΔT>–<Δ2T><2ΔT>) и особенными свойствами [23]. В связи с несистемным подходом при изучении фазообразований в указанных системах целью настоящей работы является изучение фазовых равновесий в тройных оксидных системах $Na_2O–R_2O_3–B_2O_3$ (R = In, Sc, Yb).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исходными веществами служили Na_2CO_3 (ч.д.а.), Sc_2O_3 (х.ч.), In_2O_3 (х.ч.), Yb_2O_3 (х.ч.), H_3BO_3 (ч.д.а.). Реакционные смеси определенного стехиометрического соотношения (табл. 2) взвешивались и отжигались в муфеле в температурном интервале от 500 до 550 °С. Взаимодействия в системах исследовалось до образования жидкой фазы, то есть в субсолидусной области. Общая продолжительность отжига составляла 200–240 ч. Первоначальным шагом при изучении данных систем являлся твердофазный синтез и рентгенофазовый анализ составов соединений из табл. 1. Далее для уточнения триангуляции системы и/или локализации составов новых соединений «набирались» дополнительные реакционные смеси. Рентгенофазовый анализ проводился на дифрактометре D8 ADVANCE (CuKα-излучением, детектор VÅNTEC) (Bruker AXS, Германия).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В системах $Na_2O–R_2O_3$ (R = Sc, In) зафиксировано образование $NaRO_2$ (R = Sc, In) [30, 31]. Кристаллографические характеристики $NaRO_2$ (R = Sc, In) представлены в источниках [30, 31]. В системах $R_2O_3–B_2O_3$ (R = Sc, In) зафиксировано образование RBO_2 (R = Sc, In) [32, 33].

Данные по двойной оксидной системе $Na_2O–B_2O_3$ представлены в работе Ф.Я. Галахова[1]: Na_3BO_3, $Na_{10}B_4O_{11}$, $Na_4B_2O_5$, $Na_6B_4O_9$, $NaBO_2$, $Na_4B_6O_{11}$, $Na_2B_4O_7$, $Na_4B_{10}O_{17}$, NaB_3O_5, $Na_2B_8O_{13}$, NaB_5O_8, NaB_9O_{14}.

В области, богатой оксидом натрия (более 50 мол.% Na_2O), системы становятся неравновесными в силу неполного разложения карбоната до оксида. Поэтому область тройной оксидной системы была ограничена $R_2O_3–NaRO_2–NaBO_2–B_2O_3$.

Составы реакционных смесей изучаемых систем, условия синтеза и их фазовый состав представлены в табл. 2. Номер образца соответствует мольному соотношению оксидов натрия, редкоземельного элемента и бора соответственно.

Фазообразование в системе $Na_2O–Sc_2O_3–B_2O_3$. Ранее установлено образование следующих фаз: $Na_3Sc(BO_3)_2$ [11], $Na_3Sc_2(BO_3)_3$ [15], $NaScB_2O_5$ [12].

Таблица 1. Известные составы соединений в системах $Na_2O–R_2O_3–B_2O_3$ (R = *Ln*, Bi, Y, In, Sc, Fe, Ga, Cr, Al)

Table 1. Known compounds in $Na_2O–R_2O_3–B_2O_3$ (R = *Ln*, Bi, Y, In, Sc, Fe, Ga, Cr, Al) systems

Элемент	Соединение							
	$Na_3R(BO_3)_2$	$NaRB_2O_5$	$Na_3RB_4O_9$	$Na_3R_2(BO_3)_3$	$Na_2R_2B_2O_7$	$Na_3R_3(BO_3)_4$	$Na_3R_9B_8O_{27}$	$Na_3RB_8O_{15}$
La	$P2_1/c$ [7, 8]	–	–	*Amm*2 [8]	$P2_1/c$ [16]	–	*P*-62*m* [24]	–
Bi	–	–	–	–	–	–	–	–
Ce	–	–	–	–	–	–	–	–
Pr	$P2_1/c$ [9]	–	–	–	–	–	–	–
Nd	$P2_1/c$ [7, 8]	–	–	*Amm*2 [8]	$P2_1/c$ [17]	–	*P*-62*m* [25]	–
Sm	$P2_1/c$ [9]	–	–	*Amm*2 [8]	$P2_1/c$ [18]	–	–	–
Eu	$P2_1/c$ [9]	–	–	–	$P2_1/c$ [18]	–	–	*P*-1 [27]
Gd	$P2_1/c$ [10]	–	–	*Amm*2 [14]	$P2_1/c$ [18]	–	–	*P*-1 [28]
Tb	–	–	–	–	$P2_1/c$ [19]	–	–	–
Dy	–	–	–	–	–	–	–	–
Ho	–	–	–	–	–	–	–	–
Y	$P2_1/c$ [10]	–	–	–	$P2_1/c$ [20]	$P6_3mc$ [23]	*P*-62*m* [26]	–
Er	–	–	–	–	–	–	–	–
Tm	–	–	–	–	–	–	–	–
Yb	–	–	–	–	–	–	–	–
Lu	–	–	–	–	–	–	–	–
In	–	–	–	–	–	–	–	–
Sc	$P2_1/c$ [11]	$P2_1/c$ [12]	–	*R*-3*c* [15]	–	–	–	–
Fe	–	–	–	–	–	–	–	–
Ga	–	–	$P2_1/m$ [13]	–	$P2_1/c$ [21]	–	–	–
Cr	–	–	–	–	–	–	–	–
Al	–	–	–	–	$P2_1/c$ [22]	–	–	$P2_1/c$ [29]

Примечание. Указаны пространственные группы симметрии и ссылки на источники литературы.

[1] Диаграммы состояния систем тугоплавких оксидов: справочник. Вып. 5. Двойные системы / отв. ред. Ф.Я. Галахов. Л.: Наука, 1985. 384 с.

Таблица 2. Составы реакционных смесей и их фазовый состав

Table 2. Compositions of reaction mixtures and their phase composition

Номер образца	Na_2O	Sc_2O_3	B_2O_3	Фазовый состав
312	3	1	2	$Na_3Sc(BO_3)_2$
323	3	2	3	$Na_3Sc_2(BO_3)_3$
112	1	1	2	$NaScB_2O_5$
314	3	1	4	$NaScB_2O_5$, $NaBO_2$
111	1	1	1	Sc_2O_3, $Na_3Sc_2(BO_3)_3$
334	3	3	4	$Na_3Sc_2(BO_3)_3$, Sc_2O_3, $NaScB_2O_5$
318	3	1	8	$ScBO_3$, $NaScB_2O_5$, X
398	3	9	8	$ScBO_3$, Sc_2O_3, $NaScB_2O_5$
424	4	2	4	$Na_3Sc_2(BO_3)_3$, $NaBO_2$
631	6	3	1	$NaScO_2$, $Na_3Sc(BO_3)_2$, Sc_2O_3, Na_2CO_3
611	6	1	1	Na_2CO_3, $Na_3Sc(BO_3)_2$, $NaScO_2$, Sc_2O_3
2313	2	3	13	$ScBO_3$, $Na_2B_8O_{13}$
613	6	1	3	$Na_3Sc(BO_3)_2$, $NaBO_2$
118	1	1	8	$ScBO_3$, $Na_2B_8O_{13}$
17238	17	2	38	X, $Na_2B_4O_7$
Номер образца	Na_2O	In_2O_3	B_2O_3	Фазовый состав
312	3	1	2	In_2O_3, $NaBO_2$, $NaInO_2$
323	3	2	3	$NaBO_2$, In_2O_3
112	1	1	2	$InBO_3$, $NaBO_2$
314	3	1	4	$InBO_3$, $NaBO_2$
111	1	1	1	In_2O_3, $NaBO_2$
334	3	3	4	$InBO_3$, $NaBO_2$, In_2O_3
318	3	1	8	$InBO_3$, $Na_2B_4O_7$
398	3	9	8	$InBO_3$, $NaBO_2$, In_2O_3
631	6	3	1	$NaInO_2$
611	6	1	1	$NaInO_2$, Na_2CO_3
613	6	1	3	$NaBO_2$, $NaInO_2$
118	1	1	8	$InBO_3$, $Na_2B_8O_{13}$
Номер образца	Na_2O	Yb_2O_3	B_2O_3	Фазовый состав
312	3	1	2	$Na_3Yb(BO_3)_2$
323	3	2	3	$Na_3Yb(BO_3)_2$, $YbBO_3$
112	1	1	2	$YbBO_3$, $NaBO_2$
314	3	1	4	$YbBO_3$, $NaBO_2$
111	1	1	1	$Na_3Yb(BO_3)_2$, $YbBO_3$, Yb_2O_3, Y
334	3	3	4	$Na_3Yb(BO_3)_2$, $YbBO_3$
318	3	1	8	$Na_3YbB_8O_{15}$, $YbBO_3$
398	3	9	8	Yb_2O_3, $YbBO_3$, $Na_3Yb(BO_3)_2$
311	3	1	1	$Na_3Yb(BO_3)_2$, Yb_2O_3
794	7	9	4	Yb_2O_3, $Na_3Yb(BO_3)_2$
12 10 7	12	10	7	Yb_2O_3, $Na_3Yb(BO_3)_2$
6113	6	1	13	Yb_2O_3, $Na_2B_4O_7$
613	6	1	3	$Na_3Yb(BO_3)_2$
118	1	1	8	$YbBO_3$, $Na_2B_8O_{13}$
Номер образца	Na_2O	Bi_2O_3	B_2O_3	Фазовый состав
312	3	1	2	Неизвестные фазы, требует уточнения
314	3	1	4	$Bi_4B_2O_9$, $NaBO_2$
323	3	2	3	Bi_2O_3, $NaBO_2$, $Bi_{24}B_2O_{39}$
111	1	1	1	Bi_2O_3, X
334	3	3	4	$Bi_4B_2O_9$, $NaBO_2$, Bi_2O_3
112	1	1	2	$Bi_4B_2O_9$, $NaBO_2$
318	3	1	8	$Bi_4B_2O_9$, $NaBO_2$
398	3	9	8	Неизвестные фазы, требует уточнения
611	6	1	1	$Bi_4B_2O_9$
613	6	3	1	Неизвестные фазы, требует уточнения

В результате проведенного анализа осуществлено триангулирование системы $Na_2O–Sc_2O_3–B_2O_3$ при 750 °C (рис. 1). Разрез $Sc_2O_3–NaBO_2$ квазибинарен, что доказано точками «111» и «424». Разрез $Sc_2O_3–Na_3Sc(BO_3)_2$ проведен по аналогии с источником [34], на наш взгляд, в данной области аналогичных систем доминируют оксиды редкоземельных элементов и обычно квазибинарные разрезы проводятся таким образом [35]. В области $Sc_2O_3–NaBO_2–ScBO_3$ также доминирует оксид редкоземельного элемента, что подтверждается составами «334» и «398». В области $ScBO_3–NaBO_2–B_2O_3$ доминирующим веществом становится $ScBO_3$, поэтому проведены разрезы $ScBO_3–Na_2O•xB_2O_3$ (x = 1, 3, 4, 5), что также согласуется с данными источника [34].

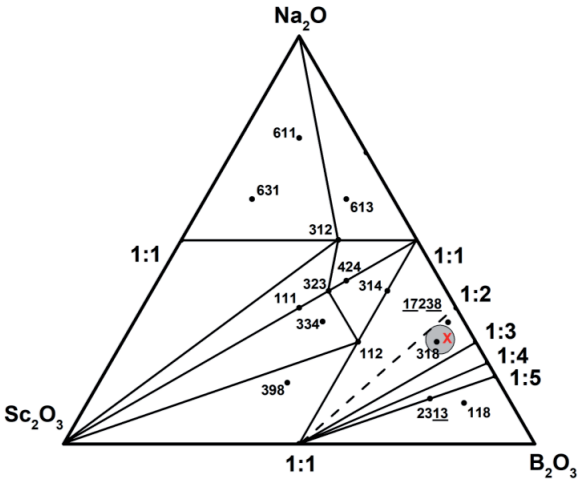


Рис. 1. Триангуляция системы $Na_2O–Sc_2O_3–B_2O_3$ при 750 °C

Fig. 1. Triangulation of the $Na_2O–Sc_2O_3–B_2O_3$ system at 750 °C

Состав «318» показал неидентифицируемые рефлексы на дифрактограмме, которые приписываются нами новой фазе в данной системе. Наряду с неидентифицируемыми рефлексами наблюдаются рефлексы фазы $ScBO_3$ и $NaSc(BO_3)_2$, что свидетельствует, на наш взгляд, об избытке оксида скандия и бора. Для локализации области нового соединения нами изучен состав «17238», однако интенсивности рефлексов новой фазы понизились, что говорит об отдалении от истинного состава.

Согласно литературному обзору, в данной области локализуются составы $Na_3GdB_8O_{15}$ [28], $K(Rb)_3RB_6O_{12}$ [37]. Сравнение дифрактограмм литературных данных и состава «318» показало неизоструктурность данных соединений. Тем не менее можно полагать, что борокислородный мотив аналогичен известным соединениям: $Na_3GdB_8O_{15}$ или $K(Rb)_3RB_6O_{12}$.

Состав «318» удалось индицировать в моноклинной сингонии (ориентировочная пространственная группа симметрии *Cc*) с параметрами a = 12,625(6), b = 7,725(2), c = 10,409(3), β = 53,19(2)°. Полученные данные обработаны методом Ле-Бейля (рис. 2, табл. 3).

Фазообразование в системе $Na_2O–In_2O_3–B_2O_3$. На рис. 3 представлена триангуляция системы $Na_2O–In_2O_3–B_2O_3$. По нашим данным, она является эвтектической (см. табл. 2). Установлены квазибинарные разрезы $NaInO_2–NaBO_2$, $In_2O_3–NaBO_2$, $InBO_3–NaBO_2$, остальные разрезы проведены с учетом полученных экспериментальных и литературных данных.

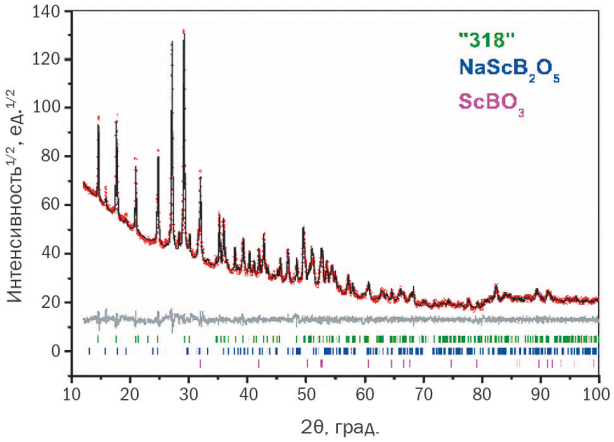


Рис. 2. Обработка дифрактограммы состава «318» методом Ле-Бейля

Fig. 2. Le Bail refinement of the diffraction pattern for composition “318”

Таблица 3. Параметры элементарной ячейки и *R*-факторы нового двойного бората в составе «318»

Table 3. Unit cell parameters and *R*-factors of the new double borate in “318”

Пространственная группа симметрии	Моноклинная, Cc
a, Å	12,625(5)
b, Å	7,725(2)
c, Å	10,409(3)
β, град.	53,19(2)
2θ-интервал, град.	5–100
R_{wp}, %	4,540
R_p, %	3,490
R_{exp}, %	2,775
χ^2	1,636
$R_{B(318)}$, %	0,155
$R_{B(ScBO3)}$, %	1,670
$R_{B(NaSc(BO3)2)}$, %	1,223

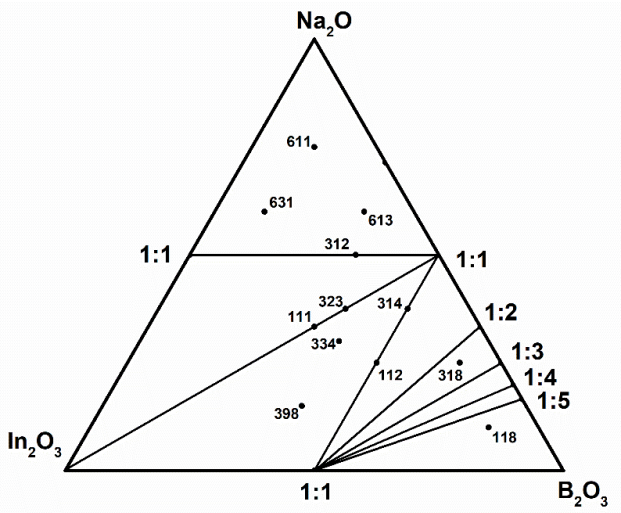


Рис. 3. Триангуляция системы $Na_2O–In_2O_3–B_2O_3$ при 750 °C

Fig. 3. Triangulation of the $Na_2O–In_2O_3–B_2O_3$ system at 750 °C

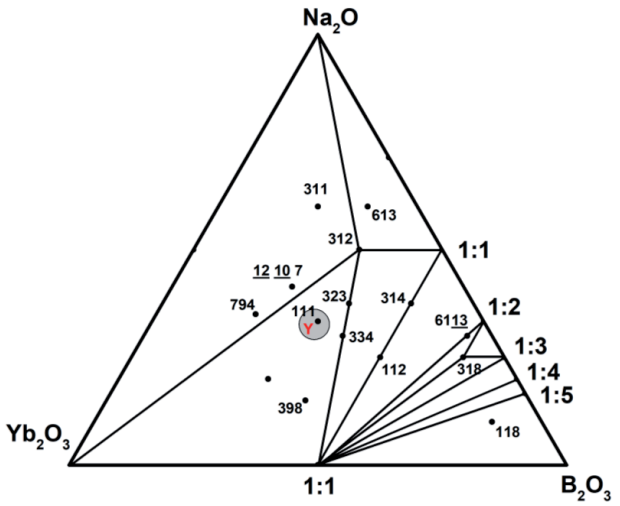


Рис. 4. Триангуляция системы $Na_2O–Yb_2O_3–B_2O_3$ при 750 °C

Fig. 4. Triangulation of the $Na_2O–Yb_2O_3–B_2O_3$ system at 750 °C

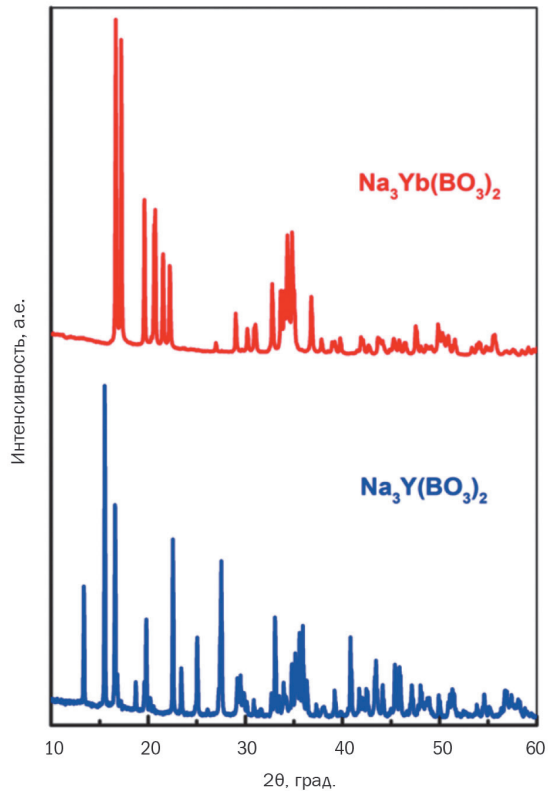


Рис. 5. Сравнение дифрактограмм $Na_3Y(BO_3)_2$ и $Na_3Yb(BO_3)_2$

Fig. 5. Comparison of $Na_3Y(BO_3)_2$ and $Na_3Yb(BO_3)_2$ diffraction patterns

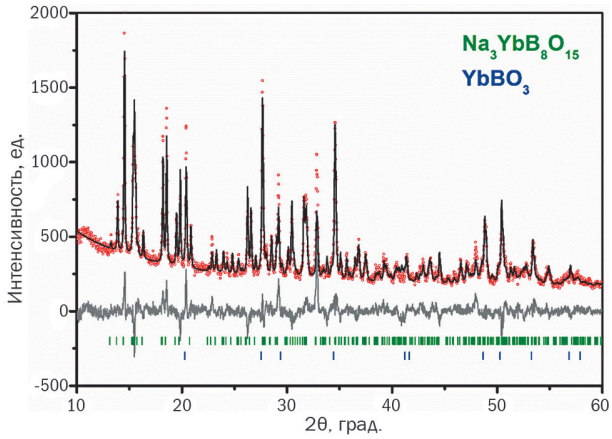


Рис. 6. Экспериментальные, рассчитанные и разностные дифрактограммы $Na_3YbB_8O_{15}$ и $YbBO_3$ в составе «318»

Fig. 6. Experimental, calculated and difference diffraction patterns of $Na_3YbB_8O_{15}$ and $YbBO_3$ in the composition "318"

Фазообразование в системе $Na_2O–Yb_2O_3–B_2O_3$. Триангуляция $Na_2O–Yb_2O_3–B_2O_3$ представлена на рис. 4, а фазовый состав реакционных смесей – в табл. 2. Установлено образование двойных боратов $Na_3R(BO_3)_2$ (R = La, Pr–Gd, Y, Sc), кристаллизующихся в пространственной группе симметрии $P2_1/c$ [7–11]. В работе [37] нами проиллюстрировано образование и термическое поведение $Na_3Er(BO_3)_2$, кристаллизующегося в том же структурном типе ($P2_1/c$). В данном материале показано также образование двойного бората $Na_3Yb(BO_3)_2$. Однако его порошкограмма свидетельствует о формировании структурного типа, отличного от $Na_3R(BO_3)_2$ (R = La, Pr–Gd, Y, Sc) (рис. 5.). Установлено образование $Na_3YbB_8O_{15}$, изоструктурного $Na_3GdB_8O_{15}$ [28], что доказано методом Ритвельда (рис. 6). Кроме того, не исключена возможность существования еще одной новой фазы в системе, поскольку наряду с рефлексами фаз $Na_3Yb(BO_3)_2$, $YbBO_3$, Yb_2O_3 зафиксированы неидентифицируемые рефлексы на дифрактограмме состава «111».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования впервые изучалось фазообразование в тройных оксидных системах $Na_2O–R_2O_3–B_2O_3$ (R = Sc, In, Yb). Установлено образование нового двойного бората натрия-скандия в области состава $3Na_2O•Sc_2O_3•8B_2O_3$. Методом автоиндицирования определена сингония (моноклинная), пространственная группа (Cc) и параметры (a = 12,625(6), b = 7,725(2), c = 10,409(3), β = 53,19(2)°). Найден новый изоструктурный аналог $Na_3GdB_8O_{15}$ [28] на основе иттербия. Впервые проведена триангуляция системы $Na_2O–In_2O_3–B_2O_3$, образование тройных соединений в ней не обнаружено.

REFERENCES

1. Chen C., Sasaki T., Li R., Wu Y., Lin Z., Mori Y., et al. *Nonlinear optical borate crystals: principles and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2012, 406 p. DOI: 10.1002/9783527646388.

2. Mutailipu M., Poeppelmeier K.R., Pan S. Borates: a rich source for optical materials. *Chemical Reviews*. 2021;121(3):1130-1202. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00796.

3. Omanwar S.K., Sonekar R.P., Bajaj N.S. *Borate phosphors: processing to applications*. Boca Raton: Imprint CRC Press; 2022, 320 p. DOI: 10.1201/9781003207757.

4. Sharma L., Adiga S.P., Alshareef H.N., Barpanda P. Fluorophosphates: next generation cathode materials for rechargeable batteries. *Advanced Energy Materials*. 2020;10(43):2001449. DOI: 10.1002/aenm.202001449.

5. Yang S.-H., Xue H., Guo S.-P. Borates as promising electrode materials for rechargeable batteries. *Coordination Chemistry Reviews*. 2021;427:213551. DOI: 10.1016/j.ccr.2020.213551

6. Yu H., Pan Z., Zhang H., Wang J. Recent advances in self-frequency-doubling crystals. *Journal of Materiomics*. 2016;2(1):55-65. DOI: 10.1016/j.jmat.2015.12.001.

7. Mascetti J., Vlasse M., Fouassier C. The crystal chemistry of the new rare-earth sodium borates $Na_3Ln(BO_3)_2$(Ln = La, Nd). *Journal of Solid State Chemistry*. 1981;39(3):288-293. DOI: 10.1016/0022-4596(81)90262-0.

8. Mascetti J., Fouassier C., Hagenmuller P. Concentration quenching of the Nd^{3+} emission in alkali rare earth borates. *Journal of Solid State Chemistry*. 1983;50(2):204-212. DOI: 10.1016/0022-4596(83)90189-5.

9. Wang Z., Li H., Cai G., Jin Z. Synthesis, crystal structure, and thermal stability of new borates $Na_3REB_2O_6$ (RE = Pr, Sm, Eu). *Powder Diffraction*. 2016;31(2):110-117. DOI: 10.1017/s0885715616000051.

10. Zhang Y., Chen X.L., Liang J.K., Xu T. Synthesis and structural study of new rare earth sodium borates $Na_3Ln(BO3)_2$ (Ln = Y, Gd). *Journal of Alloys and Compounds*. 2002;333(1-2): 72-75. DOI: 10.1016/S0925-8388(01)01689-9.

11. Fang J., Zhang X., Yao J., Zhang G., Wang K. Trisodium scandium bis(orthoborate). *Acta Crystallographica Section E*. 2012;68(36). DOI: 10.1107/S1600536812015061.

12. Becker P., Held P. Crystal structure of sodium scandium borate, $NaScB_2O_5$. *Zeitschrift für Kristallographie – New Crystal Structures*. 2001;216 (1-4):35. DOI: 10.1524/ncrs.2001.216.14.35.

13. Becker P., Fröhlich R. Crystal structure of trisodium gallium borate, $Na_3GaB_4O_9$, a new anhydrous borate structure type. *Zeitschrift für Kristallographie – New Crystal Structures*. 2001;216(1-4):31-32. DOI: 10.1524/ncrs.2001.216.14.31.

14. Zhou W.W., Zhuang R.Z., Zhao W., Wang G.F., Zhang L.Z., Ma J.G., et al. Second harmonic generation in $Na_3Gd_2(BO_3)_3$ crystals. *Crystal Research and Technology*. 2011;46(9):926-930. DOI: 10.1002/crat.201100077.

15. Yang Z., Ye N., Keszler D.A. $Na_3Sc_2(BO_3)_3$. *Acta Crystallographica Section E*. 2006;62(12):266-268. DOI: 10.1107/S1600536806036737.

16. Nagpure P.A., Omanwar S.K. Synthesis and photoluminescence study of rare earth activated phosphor $Na_2La_2B_2O_7$. *Journal of Luminescence*. 2012;132(8):2088-2091. DOI: 10.1016/j.jlumin.2012.03.068.

17. Shan F., Zhang G., Yao J., Xu T., Zhang X., Fu Y., et al. Growth, structure, and optical properties of a self-activated crystal: $Na_2Nd_2O(BO_3)_2$. *Optical Materials*. 2015;46:461-466. DOI: 10.1016/j.optmat.2015.05.004.

18. Corbel G., Leblanc M., Antic-Fidancev E., Lemaî tre-Blaise M. Crystal structure of sodium rare earth oxyborates $Na_2Ln_2(BO_3)_2O$ (Ln = Sm, Eu, and Gd) and optical analysis of $Na_2Gd_2(BO_3)_2O:Eu^{3+}$. *Journal of Solid State Chemistry*. 1999;144(1):35-44. DOI: 10.1006/jssc.1998.8107.

19. Jia Z., Xia M. Congruent melt terbium-rich borate $Na_2Tb_2B_2O_7$: synthesis, crystal structure, optical and magnetic properties. *Journal of Alloys and Compounds*. 2018;743:537-542. DOI: 10.1016/j.jallcom.2018.02.031.

20. Soni A.K., Rai V.K., Mahata M.K. Yb^{3+} sensitized $Na_2Y_2B_2O_7:Er^{3+}$ phosphors in enhanced frequency upconversion, temperature sensing and field emission display. *Materials Research Bulletin*. 2017;89:116-124. DOI: 10.1016/j.materresbull.2017.01.009.

21. Corbel G., Leblanc M. Crystal structure of $Na_2M_2(BO_3)_2O$ (M = Al, Ga); comparison with other layered oxyborates and SiP_2O_7. *Journal of Solid State Chemistry*. 2000;154(2):344-349. DOI: 10.1006/jssc.2000.8792.

22. He M., Chen X.L., Zhou T., Hu B.Q., Xu Y.P., Xu T. Crystal structure and infrared spectra of $Na_2Al_2B_2O_7$. *Journal of Alloys and Compounds*. 2001;327(1-2):210-214. DOI: 10.1016/s0925-8388(01)01561-4.

23. Shan F., Kang L., Zhang G., Yao J., Lin Z., Xia M., et al. $Na_3Y_3(BO_3)_4$: a new noncentrosymmetric borate with an open-framework structure. *Dalton Transactions*. 2016;45(17):7205-7208. DOI: 10.1039/C6DT00950F.

24. Gravereau P., Chaminade J.-P., Pechev S., Nikolov V., Ivanova D., Peshev P. $Na_3La_9O_3(BO_3)_8$, a new oxyborate in the ternary system $Na_2O–La_2O_3–B_2O_3$: preparation and crystal structure. *Solid State Sciences*. 2002;4(7):993-998. DOI: 10.1016/S1293-2558(02)01344-4.

25. Shan F., Xia M., Zhang G., Yao J., Zhang X., Xu T., et al. Growth, structure, and optical properties of a self-activated crystal: $Na_3Nd_9O_3(BO_3)_8$. *Solid State Sciences*. 2015;41:31-35. DOI: 10.1016/j.solidstatesciences.2015.02.002.

26. Zhang J.-C., Wang Y.-H., Zhang Z.-Y., Xie P., Li H.-H., Jiang Y.-P. Vacuum ultraviolet excited photoluminescence properties of novel $Na_3Y_9O_3(BO_3)_8:Tb^{3+}$ phosphor. *Chinese Physics Letters*. 2008;25(4):1453. DOI: 10.1088/0256-307X/25/4/078.

27. Bi W.Y., Wang W., Zhang R.J. New red phosphor $Na_3EuB_8O_{15}$ with an open-window tubular structure. *Acta Crystallographica. Section C, Structural Chemistry*. 2021;77(5):235-239. DOI: 10.1107/S2053229621004071.

28. Zhao D., Li Y.-N., Fan Y.P., Liu B., Zhang S.-R., Zhang R.-J. Crystal structure, theoretical studies and luminescent properties of a new borate $Na_3GdB_8O_{15}$ with one-dimensional broad-banded anionic framework. *Dalton Transactions*. 2020;49(37):13167-13175. DOI: 10.1039/D0DT02586K.

29. Jiao J., Jin W., Zhang M., Guo Z., Yang Z., Pan S. From β-$Na_2B_6O_{10}$ to $Na_3AlB_8O_{15}$ and $Na_3A_{l2}B_7O_{15}$: structural tuning of anionic-group architectures by substitution of $[BO_4]$ by $[AlO_4]$ covalent tetrahedra. *Chemistry: a European journal*. 2022;28(4):e202103966. DOI: 10.1002/chem.202103966.

30. Hoppe R., Schepers B., Roehrborn H.J., Vielhaber E. Über oxoscandate: $LiScO_2$ und $NaScO_2$. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*. 1965;339(3-4):130-143. DOI: 10.1002/ZAAC.19653390304.

31. Hoppe R., Schepers B. Über Alkaliindate: $LiInO_2$ und $NaInO_2$. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*. 1958;295(3-4):233-240. DOI: 10.1002/ZAAC.19582950310.

32. Keszler D.A., Sun H. Structure of $ScBO_3$. *Acta Crystallographica, Section C Crystal Structure Communications*. 1988;44(9):1505-1507. DOI: 10.1107/S0108270188005086.

33. Cox J.R., Keszler D.A. InBO3. *Acta Crystallographica, Section C Crystal Structure Communications*. 1994;50(12):1857-1859. DOI: 10.1107/s0108270194003999.

34. Kargin Yu.F., Egorysheva A.V. Phase relations in the solidus region of the $Na_2O–Bi_2O_3–B_2O_3$ system. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. 2005;50(12):1942-1945.

35. Asadov M.M., Akhmedova N.A., Mamedova S.R., Tagiev D.B. Phase equilibria thermodynamic analysis,

and electrical properties of samples in the system $Li_2O–B_2O_3–Yb_2O_3$. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*. 2020;65(7):1061-1068. DOI: 10.1134/S0036023620070013.

36. Subanakov A.K., Kovtunets E.V., Bazarov B.G., Bazarova J.G. Double borates of potassium (rubidium) and rare-earth elements. *Journal of Structural Chemistry*. 2022;63(7):1153-1169. DOI: 10.1134/S0022476622070101.

37. Subanakov A.K., Kovtunets E.V., Bazarov B.G., Bazarova J.G. Synthesis, crystal structure, and thermal stability of double borate $Na_3ErB_2O_6$. *Chimica Techno Acta*. 2021;8(4):1-5. DOI: 10.15826/chimtech.2021.8.4.02.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Субанаков Алексей Карпович,
к.х.н.,
заведующий лабораторией,
Байкальский институт
природопользования СО РАН,
670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6,
Российская Федерация,
старший преподаватель,
Бурятский государственный университет
им. Доржи Банзарова,
670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а,
Российская Федерация,
✉ subanakov@binm.bscnet.ru
https://orcid.org/0000-0002-1674-283X

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

Соболев Андрей Николаевич,
лаборант,
Бурятский государственный университет
им. Доржи Банзарова,
670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а,
Российская Федерация,
Sobolevan02@mail.ru
https://orcid.org/0009-0006-2286-1380

Танхаева Алтана Сергеевна,
ведущий инженер,
АО «Хиагда»,
671510, пос. Багдарин,
Российская Федерация,
zandeeva02@mail.ru
https://orcid.org/0009-0005-9826-6070

Вклад авторов

А.К. Субанаков – разработка концепции, написание черновика рукописи, редактирование рукописи, визуализация, научное руководство.
Е.В. Ковтунец – разработка концепции, разработка методологии, формальный анализ, визуализация.
А.Н. Соболев – проведение исследования.
А.С. Танхаева – проведение исследования.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Alexey. K. Subanakov,
Cand. Sci. (Chemistry),
Head of the Laboratory,
Baikal Institute of Nature Management,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
Russian Federation,
Senior Lecturer,
Banzarov Buryat State University,
24a, Smolin St., Ulan-Ude, 670000,
Russian Federation,
✉ subanakov@binm.bscnet.ru
https://orcid.org/0000-0002-1674-283X

Evgeniy V. Kovtunets,
Researcher,
Baikal Institute of Nature Management,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
6, Sakhyanova St., Ulan-Ude, 670047,
kovtunets@binm.ru
https://orcid.org/0000-0003-1301-1983

Andrey N. Sobolev,
Laboratory Assistant,
Banzarov Buryat State University,
24a, Smolin St., Ulan-Ude, 670000,
Russian Federation,
Sobolevan02@mail.ru
https://orcid.org/0009-0006-2286-1380

Altana S. Tankhaeva,
Lead Engineer,
AO Khiagda,
Bagdarin village, 671510,
Russian Federation,
zandeeva02@mail.ru
https://orcid.org/0009-0005-9826-6070

Contribution of the authors

Alexey K. Subanakov – conceptualization, writing – original draft, editing, visualization, supervision.
Evgeniy V. Kovtunets – conceptualization, methodology, formal analysis, visualization.
Andrey N. Sobolev – investigation.
Altana S. Tankhaeva – investigation.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

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

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

Информация о статье

Поступила в редакцию 07.10.2024.
Одобрена после рецензирования 15.11.2024.
Принята к публикации 31.05.2025

Information about the article

The article was submitted 07.10.2024.
Approved after reviewing 15.11.2024.
Accepted for publication 31.05.2025

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article
EDN: BXZACK
DOI: 10.21285/achb.973

Acetaminophen-induced liver and kidney injuries in mice: treatment with *Alpinia officinarum* rhizome

Azin Delavar*, Somayeh Shahami*, Ali Sobhanian✉, Abbas Ahmadi*, Mehrdad Roghani*****

**Department of Chemistry, Islamic Azad University, Karaj, Iran*
***Department of Pharmaceutical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
****Neurophysiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran*

Abstract. *Paracetamol (acetaminophen) is widely used around the world as both an analgesic and antipyretic medication. It is effective and safe when taken in therapeutic doses; however, overdosing can result in liver and kidney toxicity in both humans as well as animals. Medicinal plants are important sources of nutrition and healthcare for humans, and many of them have demonstrated protective effects against liver and kidney injuries. This research investigates the liver and kidney protective effects of various Alpinia officinarum (galangal, I) extracts in mice exposed to acetaminophen. Specifically, it examines the effects of extracts obtained using different solvents, including polar and nonpolar organic solvents and aqueous solutions. The study's findings indicated that essential oil, hydroethanolic, and chloroform extracts have the most significant protective effects on the liver and kidney. These protective effects may attributed to the presence of flavonoids, alkaloids, terpenoids, fatty acids, and phytosterols in these extracts. In conclusion, essential oil, hydroethanol, and chloroform used for the extraction of galangal rhizome effectively isolated various bioactive components, which provided substantial protection against the liver and kidney injuries caused by paracetamol in mice.*

Keywords: *paracetamol, Alpinia officinarum (Galangal), liver and kidney injuries, medicinal plants, polar and nonpolar extracts*

Acknowledgments. *This article was a research project at Islamic Azad University, Karaj Branch, for which the authors would rather voice their sincere gratitude to them. Also, the authors appreciate Mr. Mojtaba Chaichi, the freelance ESL, EFL, EAL, ESP, and IELTS instructor, for the article.*

For citation: Delavar A., Shahami S., Sobhanian A., Ahmadi A., Roghani M. Acetaminophen-induced liver and kidney injuries in mice: treatment with *Alpinia officinarum* rhizome. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2025;15(2):167-177. DOI: 10.21285/achb.973. EDN: BXZACK.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 615.32

Повреждения печени и почек у мышей, вызванные ацетаминофеном: лечение корневищем *Alpinia officinarum*

А. Делавар*, С. Шахами*, А. Собханян✉, А. Ахмади*, М. Рогани*****

**Исламский университет Азад, филиал в г. Карадже, Карадж, Иран*
****Исламский университет Азад, филиал в г. Тегеране, Тегеран, Иран*
****Центр нейрофизиологических исследований, Университет Шахед, Тегеран, Иран*

Аннотация. *Парацетамол (ацетаминофен) широко используется во всем мире в качестве анальгетика и жаропонижающего средства. Он эффективен и безопасен при приеме в терапевтических дозах, однако его передо-*

© Delavar A., Shahami S., Sobhanian A., Ahmadi A., Roghani M., 2025

зировка может привести к токсическому поражению печени и почек как у людей, так и у животных. Лекарственные растения являются важным компонентом в рационе питания человека, а также активно применяются в области здравоохранения, и многие из них обладают защитным эффектом от повреждений печени и почек. Данное исследование направлено на изучение защитных эффектов различных экстрактов Alpinia officinarum (галангал, I) для печени и почек у мышей, подвергшихся воздействию ацетаминофена. В частности, в ходе работы изучено влияние экстрактов, полученных с помощью различных растворителей, включая полярные, неполярные органические растворители и водные растворы. Результаты исследования показали, что эфирные масла, этанольные и хлороформенные экстракты оказывают наиболее выраженное защитное влияние на печень и почки. Это защитное влияние может быть обусловлено наличием флавоноидов, алкалоидов, терпеноидов, жирных кислот и фитостеролов в указанных экстрактах. В заключение следует отметить, что эфирное масло, этанол и хлороформ, использованные для экстракции корневища галангала, эффективно изолировали различные биоактивные компоненты, что обеспечило существенную защиту от поражения печени и почек, вызванного парацетамолом у мышей.

Ключевые слова: *парацетамол, Alpinia officinarum (галангал), заболевания печени и почек, лекарственные растения, полярные и неполярные растворители*

Благодарности. *Статья является частью исследовательского проекта Исламского университета Азад (филиал в г. Карадже), за который авторы хотели бы выразить искреннюю благодарность. Также авторы выражают признательность г-ну Моджтабе Чайчи, внештатному инструктору ESL, EFL, EAL, ESP и IELTS, за помощь в написании статьи.*

Для цитирования: Делавар А., Шахами С., Собханян А., Ахмади А., Рогани М. Повреждения печени и почек у мышей, вызванные ацетаминофеном: лечение корневищем *Alpinia officinarum* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 167–177. DOI: 10.21285/achb.973. EDN: BXZACK.

INTRODUCTION

The drug-induced liver toxicity (DIL) is a common cause of liver injury, responsible for about half of the cases of acute liver failure. While the drug-induced liver injury usually resolves after discontinuation of the offending medication, it presents significant diagnostic as well as therapeutic challenges for physicians. The most common clinical presentations include acute hepatitis and cholestasis, but various other clinical pathological patterns of both acute and the chronic liver disease may occur as well.

The development of the drug-induced liver disease typically involves either the parent drug or its metabolites, which can affect cellular biochemistry or trigger an immune response directly. Per hepatotoxin is associated with a specific pattern of injury as well as latency. However, some drugs can lead to more than one type of injury pattern [1–3].

The drug-induced nephrotoxicity (DIN) is a main cause of the kidney damage, contributing to high rates of mortality and morbidity. This serious issue restricts the clinical use of various therapeutic and diagnostic agents, including antineoplastic drugs, antibiotics, immunosuppressive agents, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), as well as contrast agents [4, 5].

Several medications, such as chemotherapy drugs, antimicrobials, immunosuppressants, NSAIDs, and radiocontrast agents, can adversely affect the liver and kidneys. Research has shown that the hepatic and nephrotoxic effects of some of these medications may be mitigated by the use of natural products. While certain NSAIDs, like acetaminophen (N-acetyl-p-aminophenol, APAP), are generally safe at therapeutic doses, they can lead to liver and kidney toxicity in cases of overdose, which poses an increasingly significant public health concern [4–7].

Recent studies have proved that various natural products, like phytochemicals, plant extracts, herbal formulations, and animal-derived compounds, provide protective effects against drug-induced liver (DIL) and kidney injury (DIN). These natural products operate through multi-target therapeutic mechanisms, like inhibiting oxidative stress, inflammation, apoptosis, fibrosis, and necroptosis. Additionally, they help to regulate autophagy and maintain cell polarity by influencing various signaling pathways and new molecular targets. Such compounds also show a diverse set of activities, like immunomodulatory and antiviral effects [8, 9].

Alpinia officinarum, commonly known as galangal (I), is a perennial, rhizomatous herb that belongs to the Zingiberaceae family. It's typically found in both tropical and subtropical regions of South Asia. This plant serves both medicinal and culinary purposes. Its dried rhizome has been traditionally used for centuries to relieve symptoms such as stomach aches, colds, ulcers, and diarrhea. Recent pharmacological studies have proved that galangal offers a range of beneficial effects, like anti-inflammatory, antioxidant, antidiabetic, anti-ulcer, anti-diarrheal, antiemetic, analgesic, anticoagulant, and antitumor properties. Other research has identified the primary components of galangal as volatile oils, flavonoids, glycosides, and diarylheptanoids, which contribute to its diverse medicinal qualities [10].

Recent studies have highlighted the pharmacological properties of galangal, which are primarily attributed to its flavonoids and diarylheptanoids. These compounds are significant for their anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer properties, as well as their ability to combat multi-drug-resistant strains. One particularly notable compound found in galangal, galangin, is a bioflavonoid that shows considerable potential in treating various diseases [11].

In this work, according to the mentioned pharmacological activities of this plant, the therapeutic effects of galangal extracts obtained using organic and organo-aqueous solvents with different polarities on liver and kidney injuries caused by acetaminophen were studied, and the results were compared to the control and other groups in mice.

MATERIAL AND METHODS

Chloroform, ethanol, carbon tetrachloride, and the other chemicals were provided from Sigma-Aldrich (USA) and Merck (Darmstadt, Germany) chemical companies.

Gas chromatographic analysis was conducted on an Agilent 7890N chromatograph paired with a mass-spectrometer 5975C, MODE EI. A capillary column, HP-5MS (30 m × 0.25 mm i.d.; the film thickness 0.25 μm) was applied. Its column function program was as follows: 60 °C for 2 min and then 7 °C/min to 280 °C. The carrier gas was helium at the rate of 3 ml/min. The samples (1 μl) of diluted essential oils were injected by hand. The parts of extracts were noticed through the retention time, the retention indices which are related to C_6-C_{35} phytochemicals computer matching with Wiley/NIST library and comparing their mass spectra with the genuine samples or with available data in the literature. The proportion of the mixture of the seen compounds was evaluated from the GC peak area with no correction factors, and relatively calculated.

Rizhomes of *Alpinia officinarum* (I) were obtained from the local market in Tehran and authenticated in the herbarium laboratory of the Iranian Institute of Medicinal Plants (Voucher Numbers: IMPHM-8). These parts of I were kept away from sunlight. Then air-dried in the shade, powdered well, then extracted by maceration with mentioned solvents with different polarities (96% hydroethanol, chloroform, carbon tetrachloride, and aqueous) separately for 72 hours (100 g of the powdered plant macerated in 500 ml solvent). The compositions were filtered and concentrated to yield extracts that were used for GC-MS analysis and protective effects on acetaminophen-induced liver & kidney injuries in mice.

96 NMRI mice weighing 20 to 25 g (Pasteur's Institute in Tehran-Iran) were kept in an air-conditioned animal house room at 22±2 °C and obtained with a standard diet and tap water. The procedures were in compliance with NIH guidelines for the care and use of the research animals.

Mice were desultorily divided into control, acetaminophen, acetaminophen + chloroform, acetaminophen + carbon tetrachloride, acetaminophen + hydroalcoholic extracts, and the acetaminophen + essential oil groups. These extracts (200 mg/kg) are dissolved in the cold physiologic saline and fed daily by gavage to mice one week before acetaminophen injection (300 mg/kg, i.p.) for liver and kidney toxicity.

Liver and kidney homogenates were prepared based on a published report [12].

The homogenate protein content was determined according to a published report[1].

Then, liver & kidney serum markers included: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), blood urea nitrogen (BUN), Creatinine, and superoxide dismutase (SOD) were analyzed by standardized procedures using commercial kits (Pars azmoon Company, Tehran, Iran, and Kia zist, Hamedan, Iran), following the instrument manufacturer's protocol.

All the data were shown as means ±*SEM*. Statistical analysis was done with the aid of Graph Pad Prism Software version 8.0 and one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a coupled Tukey post-hoc statistical test. The Kolmogorov-Smirnov test was used for verification of normal distribution. A statistical *p*-value under 0.05 was considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

The mentioned extracts and essential oil were made from the maceration of **I** in the stated organic and aqueous solvents. GC-MS results were summarized in Table.

According to the outcomes of GC-MS data (Table), different extracts and ethereal oil of *Alpina galanga* (Galangal, I) are rich in flavonoids, alkaloids, terpenes, fatty acids, phytosterols, and phenols which have been mentioned in several articles for their antioxidant and anti-inflammatory properties [13–20].

Mortality (the death rate), morbidity (considered as any abnormal condition or behavior), irritability (a condition of aggressiveness or increased response to handling), and the other relevant abnormal states were witnessed in the animals.

Figure 1 shows the results of ALT enzyme activity in serum in different groups. As can be seen, in the acetaminophen group, there was a strong and significant rise ($P < 0.001$) compared to the control group. The same significant rise was obtained to a lesser extent in the acetaminophen groups treated with hydroethanol

The quantitative analysis of some phytochemicals in hydroethanolic, chloroform, carbon tetrachloride extracts, and volatile oil of *Alpinia officinarum* was identified by gas chromatography – mass spectrometry

Количественный анализ некоторых фитохимических веществ в экстрактах, полученных с помощью этанола, хлороформа, четыреххлористого углерода, и эфирном масле *Alpinia officinarum*, идентифицированных методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии

Chemical family	Chloroform, %	Carbon tetrachloride, %	Essential oil, %	Hydroethanolic 96%, %
Fatty acids	55.68	–	–	5.32
Terpenes	0.75	8.49	34.02	–
Alkaloids	4.11	–	10.45	12.91
Galangin (flavonoid)	8.35	8.35	–	19.00
Phytosterols	–	–	–	9.32
Other flavonoids	8.35	–	–	–
Phenols	–	–	4.65	–
Others	17.07	83.16	50.88	53.45

[1] Becker J.M., Caldwell G.A., Zachgo E.A. Biotechnology: a laboratory course. San Diego: Academic Press; 1996, 283 p.

($P < 0.05$), carbon tetrachloride ($P < 0.001$), chloroform ($P < 0.05$) extracts and essential oil ($P < 0.05$) compared to the control group. Also, in the three acetaminophen groups treated with hydroethanol, chloroform extracts, and ethereal oil ($P < 0.05$), a significant fall in alanine aminotransferase activity was obtained compared to the acetaminophen group.

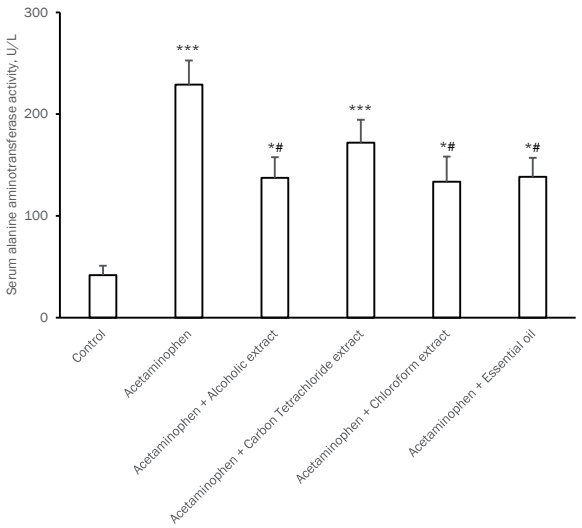


Fig. 1. Serum alanine aminotransferase activity in various groups: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (compared to the control group); # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$ (compared to the acetaminophen group)

Рис. 1. Результаты определения активности сывороточной аланинаминотрансферазы в различных группах: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (по сравнению с контрольной группой); # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$ (по сравнению с группой, принимавшей ацетаминофен)

Figure 2 shows the results of AST activity in serum in different groups. As can be seen, in the acetaminophen group, a significant rise in the activity of the enzyme was obtained compared to the control group ($P < 0.001$). The same significant rise was obtained to a lesser extent in the acetaminophen groups treated with hydroethanol, chloroform, carbon tetrachloride ($P < 0.001$) extracts, and essential oil ($P < 0.01$) compared to the control group. On the other hand, in the acetaminophen groups treated with hydroethanol, chloroform, carbon tetrachloride extracts ($P < 0.001$), and volatile oil ($P < 0.01$), there was a significant fall in the activity of this enzyme compared with the acetaminophen group.

Figure 3 shows the results of ALP enzyme activity in serum in different groups. As can be seen, in the acetaminophen group, there was a strong and significant rise ($P < 0.001$) compared to the control group. The same significant rise was obtained to a lesser extent in the acetaminophen groups treated with hydroethanol, chloroform, carbon tetrachloride extracts, and volatile oil ($P < 0.001$) compared to the control group. Also, only in the acetaminophen group treated with essential oil ($P < 0.01$), a significant fall in alanine aminotransferase activity was obtained compared to the acetaminophen group.

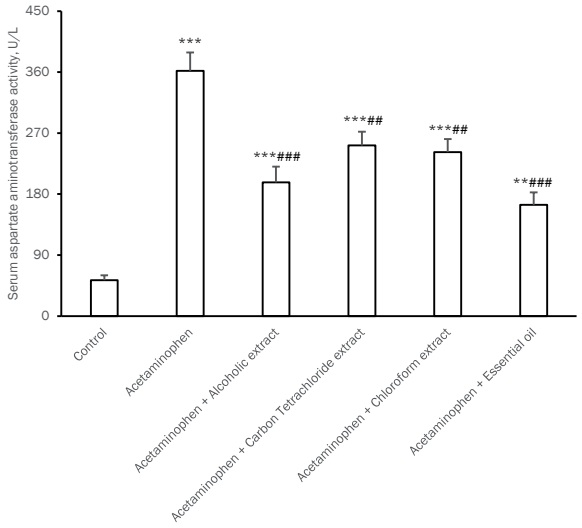


Fig. 2. Serum aspartate aminotransferase activity in various groups: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (compared to the control group); # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$ (compared to the acetaminophen group)

Рис. 2. Результаты определения активности сывороточной аспартатаминотрансферазы в различных группах: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (по сравнению с контрольной группой); # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$ (по сравнению с группой, принимавшей ацетаминофен)

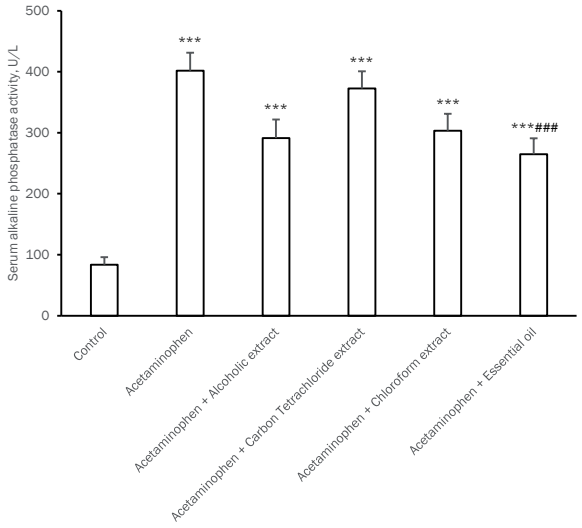


Fig. 3. Serum alkaline phosphatase activity in various groups: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (compared to the control group); # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$ (compared to the acetaminophen group)

Рис. 3. Результаты определения активности сывороточной щелочной фосфатазы в различных группах: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (по сравнению с контрольной группой); # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$ (по сравнению с группой, принимавшей ацетаминофен)

Figure 4 shows the level of MDA in liver tissue as an index of lipid peroxidation and oxidative stress in different groups. As it is shown in the acetaminophen group, there is a strong and significant rise in MDA compared with the control group ($P < 0.001$). This significant rise was seen in the acetaminophen groups treated with carbon tetrachloride ($P < 0.01$) extract compared to the control group but it was not significant in chloroform extract ($P > 0.05$). Also, in the acetaminophen groups treated with hydroethanol extracts and volatile oil, a none-significant fall in MDA was obtained compared to the acetaminophen group.

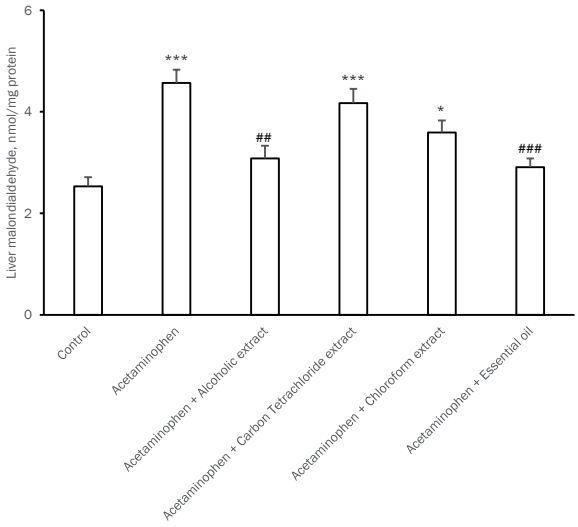


Fig. 4. Liver malondialdehyde levels in various groups: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (compared to the control group); # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$ (compared to the acetaminophen group).

Рис. 4. Результаты определения уровня малонового диальдегида в печени в различных группах: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (по сравнению с контрольной группой); # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$ (по сравнению с группой, принимавшей ацетаминофен)

Figure 5 shows the results of CAT enzyme activity in the liver tissue homogenate in different groups. As can be seen, in the acetaminophen group, a significant decrease in the activity of the enzyme was obtained compared with the control group ($P < 0.001$). The same significant decrease in catalase enzyme activity was seen in acetaminophen groups treated with carbon tetrachloride, and chloroform ($P < 0.001$) extracts compared to the control group. On the other hand, a significant rise in catalase enzyme activity was obtained only in the acetaminophen groups treated with hydroethanol extracts and ethereal oil ($P < 0.01$) compared to the acetaminophen group.

Figure 6 shows the results of serum BUN in different groups. As can be seen, in the acetaminophen group, a clear and significant increase in BUN was obtained compared to the control group ($p < 0.001$). A similar significant rise in BUN was obtained to a lesser extent in acetaminophen groups treated with hydroethanol ($p < 0.05$), carbon tetrachloride ($p < 0.001$), and chloroform ($p < 0.05$) extracts compared with the control group. On the other hand, a significant decrease in BUN was obtained

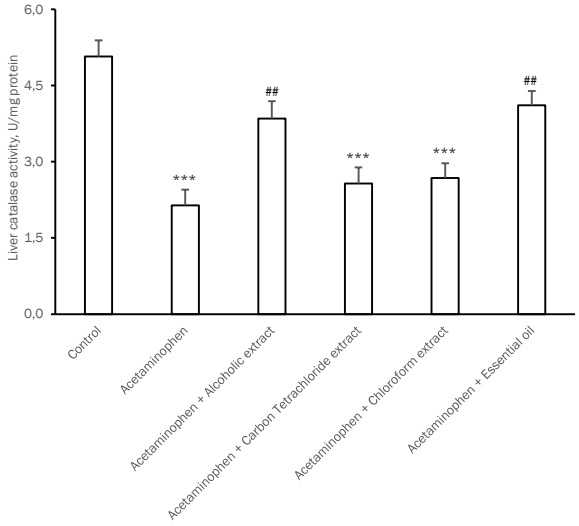


Fig. 5. Catalase enzyme activity in various groups: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (compared to the control group); # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$ (compared to the acetaminophen group).

Рис. 5. Результаты активности каталазы в различных группах: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (по сравнению с контрольной группой); # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$ (по сравнению с группой, принимавшей ацетаминофен)

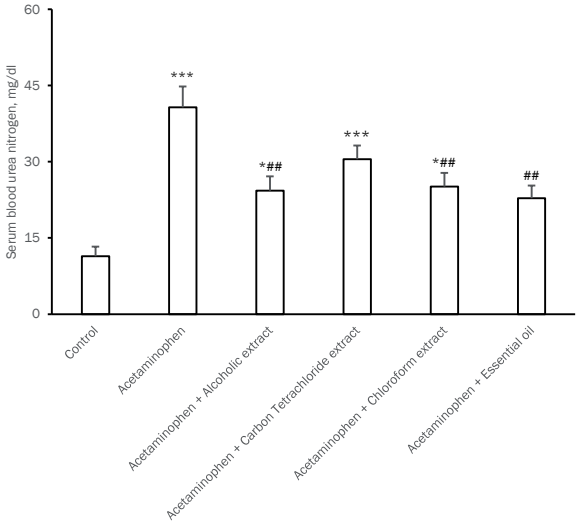


Fig. 6. Serum blood urea nitrogen in various groups: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (compared to the control group); # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$ (compared to the acetaminophen group).

Рис. 6. Результаты определения азота мочевины в сыворотке крови в различных группах: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ (по сравнению с контрольной группой); # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$ (по сравнению с группой, принимавшей ацетаминофен)

in the acetaminophen groups treated with hydroethanol, chloroform extracts, and aetherolea oil ($p < 0.01$) compared to the acetaminophen group.

Figure 7 shows the results of serum creatinine levels in various groups. As can be seen, in the acetaminophen group, a statistically significant increase in serum creatinine was obtained compared to the control group ($p < 0.01$). A similar significant rise in creatinine was not obtained in the acetaminophen group treated with extracts and essential oil compared with the control group ($p \geq 0.05$). On the other hand, a significant decrease in creatinine was not obtained in the acetaminophen groups treated with extracts and volatile oil ($P > 0.05$) compared to the acetaminophen group.

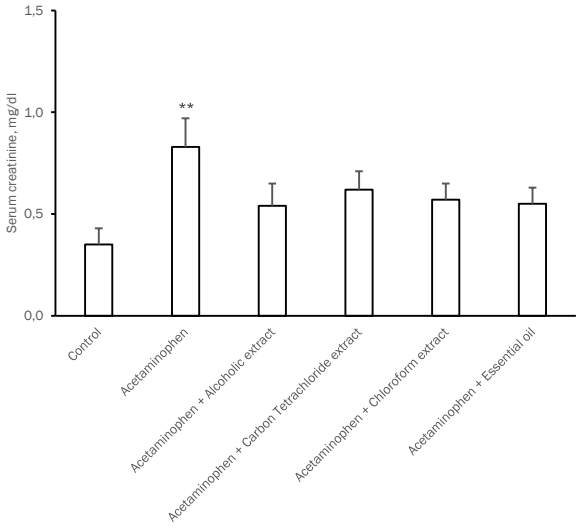


Fig. 7. Serum creatinine in various groups: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (compared to the control group); # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$ (compared to the acetaminophen group).

Рис. 7. Результаты определения сывороточного креатинина в различных группах: * – $p < 0{,}05$, ** – $p < 0{,}01$, *** – $p < 0{,}001$ (по сравнению с контрольной группой); # – $p < 0{,}05$, ## – $p < 0{,}01$, ### – $p < 0{,}001$ (по сравнению с группой, принимавшей ацетаминофен)

Figure 8 shows the outcomes related to the tissue level of MDA as an index of lipid peroxidation in kidney tissue in different groups. As can be seen, in the acetaminophen group, a strong and significant increase in malondialdehyde was observed compared to the control group ($p < 0.01$). A similar significant rise in malondialdehyde was not obtained in acetaminophen groups treated with extracts and essential oil ($P > 0.05$) compared to the control group. Also, there was a significant fall in malondialdehyde in the acetaminophen groups treated with hydroethanol extracts and aetheroleum oil ($p < 0.05$) compared to the acetaminophen group.

Figure 9 shows the results related to the kidney level of catalase enzyme in different groups. By measuring the level of catalase enzyme activity in the kidney, it was found that in the acetaminophen group, there was a significant fall in this parameter compared with the control group ($p < 0.001$). This significant fall in catalase enzyme activity was obtained in acetaminophen groups treated with carbon tetrachloride ($p < 0.001$) and chloroform ($P < 0.01$) extracts compared

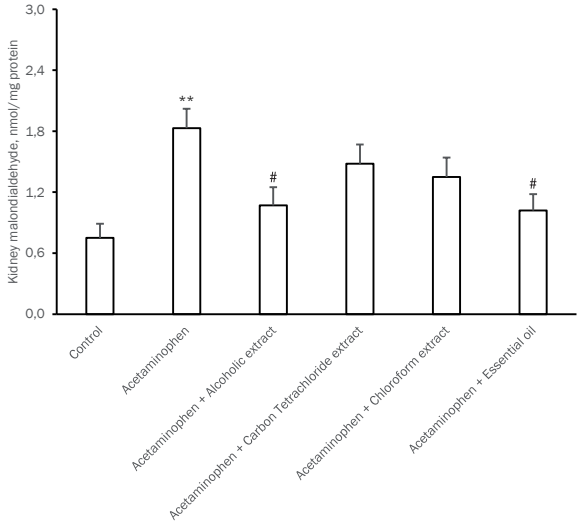


Fig. 8. Kidney malondialdehyde levels in various groups: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (compared to the control group); # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$ (compared to the acetaminophen group).

Рис. 8. Результаты определения уровня малонового диальдегида в почках в различных группах: * – $p < 0{,}05$, ** – $p < 0{,}01$, *** – $p < 0{,}001$ (по сравнению с контрольной группой); # – $p < 0{,}05$, ## – $p < 0{,}01$, ### – $p < 0{,}001$ (по сравнению с группой, принимавшей ацетаминофен)

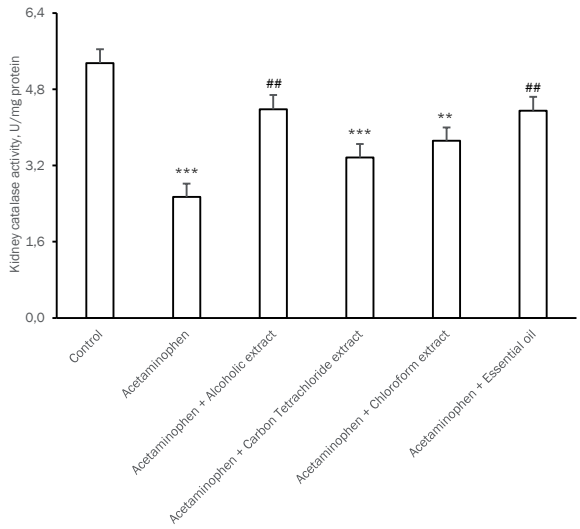


Fig. 9. Kidney catalase enzyme activity in various groups: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (compared to the control group); # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$ (compared to the acetaminophen group)

Рис. 9. Результаты определения активности каталазы в почках в различных группах: * – $p < 0{,}05$, ** – $p < 0{,}01$, *** – $p < 0{,}001$ (по сравнению с контрольной группой); # – $p < 0{,}05$, ## – $p < 0{,}01$, ### – $p < 0{,}001$ (по сравнению с группой, принимавшей ацетаминофен)

to the control group. Also, a significant rise in the renal activity of catalase enzyme was seen in the acetaminophen groups treated with hydroethanol extracts and volatile oil ($p < 0.01$) compared to the acetaminophen group.

Figure 10 shows the results related to the kidney level of SOD enzyme in different groups. By measuring the level of SOD enzyme activity in the kidney, it was found that in the acetaminophen group, there is a significant fall in this parameter compared to the control group ($p < 0.01$). This decrease in superoxide dismutase enzyme activity was obtained in acetaminophen groups treated with hydroethanol, carbon tetrachloride, chloroform extracts, and essential oil compared to the control group but was not significant ($p < 0.05$). Also, a significant rise in the renal activity of this enzyme was observed only in the acetaminophen group treated with essential oil ($p < 0.05$) compared to the acetaminophen group.

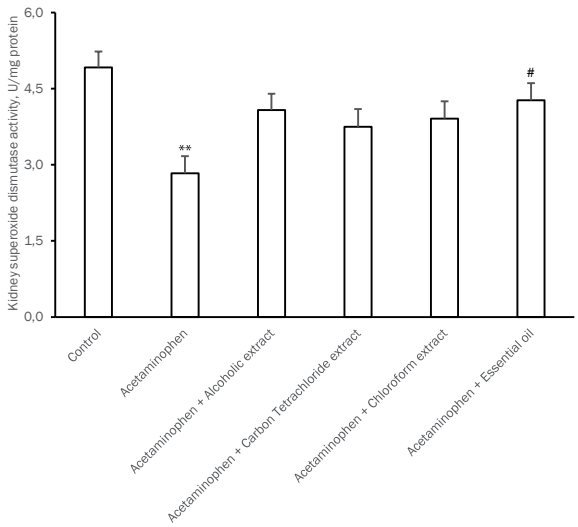


Fig. 10. Kidney superoxide dismutase enzyme activity in various groups: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ (compared to the control group); # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.001$ (compared to the acetaminophen group).

Рис. 10. Результаты определения активности супероксиддисмутазы в почках в различных группах: * – $p < 0{,}05$, ** – $p < 0{,}01$, *** – $p < 0{,}001$ (по сравнению с контрольной группой); # – $p < 0{,}05$, ## – $p < 0{,}01$, ### – $p < 0{,}001$ (по сравнению с группой, принимавшей ацетаминофен)

The liver is particularly vulnerable to drug toxicity because it metabolizes and eliminates chemicals. Drug-induced liver disorders are common and can be life-threatening, often resembling various liver diseases. However, liver injury usually resolves after stopping the medication, with rare exceptions like drug-induced chronic hepatitis [1].

Drugs or their metabolites can disrupt biochemical functions, increase the liver's sensitivity to cytokines, or trigger an immune response. Symptoms may mimic acute hepatitis or cholestasis and can vary based on factors such as environment, age, sex, and genetics [3].

Drug-induced kidney disorders are also serious complications that can impair kidney function and lead to high mortality and morbidity rates. These issues can arise from medications used for diagnosis or treatment, like chemotherapeutic agents, antimicrobials, immunosuppressants, NSAIDs, and radiocontrast agents [8, 21, 22]. Drug-induced kidney disorders are currently a leading cause of renal damage. Therefore, developing strategies to mitigate these disorders is urgently needed [23].

APAP, also known as paracetamol, is one of the widely used medications for reducing fever and relieving pain. However, excessive intake of APAP can lead to severe toxicity in the liver and kidneys, potentially resulting in acute liver failure (ALF) and acute kidney injury (AKI). Although the exact molecular mechanisms underlying the liver and kidney toxicity associated with APAP are complex, several studies have suggested that this toxicity is linked to elevated levels of Fe^{2+} in models of liver and kidney damage [24–27].

Multiple studies have demonstrated that excessive consumption of APAP can lead to decreased glutathione levels and increased production of N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI). This process results in oxidative stress, DNA damage, and cell necrosis in the liver, ultimately leading to liver damage [28].

Research has shown that natural products can activate the liver's antioxidant defense system, primarily through a key component called Nrf2. These natural substances help decrease oxidative stress damage and protect the liver. Furthermore, cytochrome P450 enzymes, which play a crucial role in metabolizing APAP into its toxic form, NAPQI, are viewed as promising targets for treating liver injury induced by APAP [29].

The accurate molecular mechanism behind APAP-induced liver injury is not yet fully understood. At therapeutic concentrations, approximately 60 to 90% of APAP is metabolized in the liver through glucuronidation and sulfation. A smaller portion, around 5 to 15%, is metabolized via the cytochrome pathway [30, 31].

Many phytochemicals are known for their properties that protect the liver. Natural substances that safeguard liver health often demonstrate a variety of effects, like antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory, and antiviral activities. These compounds may help reduce liver damage made by APAP and hold the potential for further development as antioxidants or liver-protective agents [32].

Understanding the hepatoprotective effects of natural products can inform future drug development. Two promising strategies for treating APAP induced acute liver injury are inhibiting a specific enzyme (CYP450) and activating the Nrf2 signaling pathway to enhance glutathione (GSH) synthesis. Nevertheless, challenges remain, including improving the therapeutic window, developing optimal drug carriers, and minimizing toxicity [9].

On the other hand, natural products are recognized for their kidney protective effects and are often used to treat kidney diseases. Research indicates that these products, including phytochemicals and herbal formulas, offer protection against DIN [33].

Nephrotoxicity is less common than hepatotoxicity in APAP overdose, with different metabolites causing these effects. In the liver, the metabolite NAPQI binds to proteins, leading to oxidative stress and hepatocyte necrosis. Conversely, both NAPQI and metabolites from acetaminophen-glutathione (APAP-GSH) contribute to nephrotoxicity in mice [5].

Previous studies have shown that certain phytochemicals in medicinal plants have antioxidant and anti-inflammatory properties, which can protect against hepatotoxicity and renal toxicity caused by APAP [17–22].

The study aims to evaluate the hepatoprotective and nephroprotective effects of *Alpinia officinarum* (Galangal, I) by analyzing liver parameters (ALT, AST, ALP, MDA, and CAT) and kidney parameters (BUN, creatinine, CAT, MDA, and SOD).

GC-MS analysis shows that various extracts and essential oils of I are rich in compounds such as flavonoids (like galangin), alkaloids (including capsaicin and dihydrocapsaicin), terpenes, fatty acids, phytosterols, and phenols. These compounds are noted for their antioxidant, anti-inflammatory, and oxidative stress-reducing properties, which may enhance kidney and liver functions [13–20].

For example, flavonoids have antioxidant, anti-inflammatory, anti-mutagenic, and anti-carcinogenic properties, and they regulate important cellular enzymes. They also inhibit several enzymes, like xanthine oxidase (XO), cyclooxygenase (COX), and lipoxygenase [34].

Previous studies showed that galangin significantly protects against APAP-induced acute liver (ALI) and AKI by reducing oxidative stress and increasing hepatic glutathione levels [35].

Galangin is a natural flavanol with antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer properties. It can scavenge free radicals, regulate enzymes, and lower lipid levels, potentially inhibiting liver fibrosis by reducing lipid peroxidation and blocking the activation of hepatic stellate cells [36]. It has also been studied for its effects on acute kidney injury (AKI). It reduces oxidative stress by lowering renal MDA levels and enhances the activity of antioxidant enzymes, like SOD and CAT [37]. Galangin may protect against APAP-induced acute kidney injury by reducing oxidative stress levels, similar to its effects on liver injury. However, the exact protective mechanisms in the kidneys are not fully understood [37]. It has been shown to protect kidney tissue from injury and decrease excess reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and inflammatory mediators in rats exposed to CPF intoxication. It also upregulates Nrf2 and FXR and boosts enzymatic antioxidant activity [38].

It has been widely shown that phytochemicals extracted from I have significant antioxidant and anti-inflammatory effects [13–20]. For this reason, they are potential molecules for the development of new drugs that could be specially applied for the treatment and/or control of liver and kidney diseases.

In the present study, mice that received a toxic dose of acetaminophen exhibited elevated levels of liver enzymes (ALT, AST, and ALP) in their blood. Additionally, there was an increase in the amount of MDA, which serves as an indicator of lipid peroxidation and oxidative stress. Furthermore, a decrease in the levels of catalase, one of the most important antioxidant enzymes responsible for the direct reduction of reactive oxygen species, suggests the presence of liver disease. Also, after receiving a toxic dose of acetaminophen, the serum levels of BUN and creatinine increased, while the amount of MDA also rose. In contrast, the activity of the catalase enzyme in kidney tissue showed a significant decrease.

The results indicated that Galangal essential oil, along with hydroethanolic and chloroform extracts, played a significant role in protecting the livers of mice that had been induced with acetaminophen toxicity. Notably, the levels of the liver enzymes (ALT and AST) showed a substantial decrease across all extracts, whereas ALP exhibited a significant decrease only with the essential oil. Additionally, there was a marked decrease in MDA levels, and catalase enzyme activity significantly increased with both the essential oil and the hydroethanolic extract.

Similarly, the findings also demonstrated that the essential oil and the aforementioned extracts were effective in protecting the kidneys from paracetamol poisoning. Serum levels of BUN and creatinine decreased with the use of essential oil and extracts; however, the fall in serum creatinine was not statistically significant. Moreover, there was a significant fall in MDA levels and a notable rise in catalase enzyme activity in the essential oil and hydroethanolic extract, while the chloroform extract did not yield significant changes. Finally, the kidney levels of SOD enzyme increased significantly with the essential oil, but this increase was not observed with the hydroethanolic and chloroform extracts.

The observed effects are likely because of the presence of various phytochemicals in the extracts and essence derived from the rhizome of this plant. These phytochemicals possess antioxidant and anti-inflammatory properties, which have been illustrated to significantly decrease inflammation in kidney and liver tissues.

Based on the results presented in Table, the volatile oil product contains a high concentration of terpenes, along with phenolic and alkaloid compounds that exhibit documented antioxidant and anti-inflammatory activities. This composition enabled the essential oil to demonstrate the most effective protective effects on the liver and kidneys. Following closely, the hydroethanolic and chloroform extracts, which contain galantine as well as fatty acids, alkaloids, and sterols, were also able to improve certain serum markers related to liver and kidney health, attributable to their antioxidant and anti-inflammatory activities.

The diverse pharmacological effects observed in this study were attributed to the use of solvents with varying polarities. These solvents effectively separate and concentrate terpenes, flavonoids, alkaloids, phenols, fatty acids, and sterols in extracts and volatile oil.s

It is hoped that this method could serve as a viable alternative for obtaining specific components, individual compounds, from medicinal plants, such as galangal, to reduce drug-induced toxicity in the liver and kidneys. However, it is important to note that this topic goes beyond the scope of the current study and necessitates a more detailed understanding of the metabolites involved and their mechanisms of action.

CONCLUSION

The solvent plays a key role in the extraction and separation of active medicinal compounds from plants. In this research, the extraction procedure was conducted using different solvents with varying polarities. The results indicated that essential oil, as well as hydroethanolic and chloroformic extracts from *Alpinia officinarum* rhizome, showed the most effective protection against liver and kidney injuries caused by paracetamol.

REFERENCES

1. Kaplowitz N. Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Safety*. 2001;24:483-490. DOI: 10.2165/00002018-200124070-00001.

2. Maddrey W. Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. *Gastroenterology*. 2000;118(5):984-985. DOI: 10.1016/S0016-5085(00)70192-2.

3. Kaplowitz N. Drug-induced liver injury. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;38(sup.2):S44-S48. DOI: 10.1086/381446.

4. Perazella M.A. Pharmacology behind common drug nephrotoxicities. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2018;13(12):1897-1908. DOI: 10.2215/cjn.00150118.

5. Stern S.T., Bruno M.K., Hennig G.E., Horton R.A., Roberts J.C., Cohen S.D. Contribution of acetaminophen-cysteine to acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice: I. Enhancement of acetaminophen nephrotoxicity by acetaminophen-cysteine. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005;202(2):151-159. DOI: 10.1016/j.taap.2004.06.030.

6. Jaeschke H., Bajt M.L. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicological Sciences*. 2006;89(1):31-41. DOI: 10.1093/toxsci/kfi336.

7. He M., Zhang S., Jiao Y., Lin X., Huang J., Chen C., et al. Effects and mechanisms of rifampin on hepatotoxicity of acetaminophen in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(9):3142-3149. DOI: 10.1016/j.fct.2012.06.020.

8. Gao C., Liu C., Chen Y., Wang Q., Hao Z. Protective effects of natural products against drug-induced nephrotoxicity: a review in recent years. F*ood and Chemical Toxicology*. 2021;153:112255. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112255.

9. Liao J., Lu Q., Li Z., Li J., Zhao Q., Li J. Acetaminophen-induced liver injury: molecular mechanism and treatments from natural products. *Frontiers in Pharmacology*. 2023;14:1122632. DOI: 10.3389/fphar.2023.1122632.

10. Ding P., Yang L., Feng C., Xian J. Research and application of *Alpinia officinarum* in medicinal field. *Chinese Herbal Medicines*. 2019;11(2):132-140. DOI: 10.1016/j.chmed.2019.04.003.

11. Ahmed M., Riaz S., Ahmad A., Farooq R., Mubeen U., Hussain M., et al. *Alpinia officinarum* (Galangal): a beneficial plant. *Journal of Medicine and Public Health*. 2023;4(1):1057.

12. Amraoui W., Adjabi N., Bououza F., Boumendjel M., Taibi F., Boumendjel A., et al. Modulatory role of selenium and vitamin E, natural antioxidants, against bisphenol a-induced oxidative stress in Wistar albinos rats. *Toxicological Research*. 2018;34:231-239. DOI: 10.5487/tr.2018.34.3.231.

13. Zuo X., Gao L., Peng X., Dong L., Huang M., Hu T., et al. Unveiling the role of mtDNA in Liver-Kidney Crosstalk: insights from trichloroethylene hypersensitivity syndrome. *International Immunopharmacology*. 2024;138:112513. DOI: 10.1016/j.intimp.2024.112513.

14. An Q., Ren J.-N., Li X., Fan G., Qu S.-S., Song Y., et al. Recent updates on bioactive properties of linalool. *Food & Function*. 2021;12(21):10370-10389. DOI: 10.1039/D1FO02120F.

15. Ahmadi A., Khalili M., Margedari S., Nahri-Niknafs B. Antidiabetic and antilipidemic effects of some polar and nonpolar extracts of *Securigera securidaca* flowers. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016;49:753-759. DOI: 10.1007/s11094-016-1365-6.

16. Ahmadi A., Khalili M., Mashaee F., Nahri-Niknafs B. The effects of solvent polarity on hypoglycemic and hypolipidemic activities of *Vaccinium arctostaphylos* L. unripe fruits. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2017;50:746-752. DOI: 10.1007/s11094-017-1524-4.

17. Ahmadi A., Khalili M., Roghani A., Behi A., Nazirzadeh S. The effects of solvent polarity on hypoglycemic and hypolipidemic activities of *Portulaca oleracea* and *Achillea eriophora* DC extracts. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2021;54:1243-1254. DOI: 10.1007/s11094-021-02350-y.

18. Ahmadi A., Roghani M., Parsianfard M., Seyedmomeni F., Gheraati S., Sobhanian S.A. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic evaluation of *Zingiber officinale*, *Anethum graveolens* and *Citrullus colocynthis* extracts with different polarities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022;55:1062-1070. DOI: 10.1007/s11094-021-02538-2.

19. Zheng H., Zhao J., Zheng Y., Wu J., Liu Y., Peng J., et al. Protective effects and mechanisms of total alkaloids of *Rubus alceaefolius* Poir on non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Molecular Medicine Reports*. 2014;10(4):1758-1764. DOI: 10.3892/mmr.2014.2403.

20. Rui Y., Li S., Luan F., Li D., Liu R., Zeng N. Several alkaloids in Chinese herbal medicine exert protection in acute kidney injury: focus on mechanism and target analysis. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2022:2427802. DOI: 10.1155/2022/2427802

21. Faria J., Ahmed S., Gerritsen K.G.F., Mihaila S.M., Masereeuw R. Kidney-based in vitro models for drug-induced toxicity testing. *Archives of Toxicology*. 2019;93:3397-3418. DOI: 10.1007/s00204-019-02598-0.

22. Downes K.J., Hayes M., Fitzgerald J.C., Pais G.M., Liu J., Zane N.R., et al. Mechanisms of antimicrobial-induced nephrotoxicity in children. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020;75(1):1-13. DOI: 10.1093/jac/dkz325.

23. Svenia P.J., Asha S., Krishnakumar I.M., Ratheesh M., Savitha S., Sandya S., et al. Nephro-protective effect of a novel formulation of unopened coconut inflorescence sap powder on gentamicin induced renal damage by modulating oxidative stress and inflammatory markers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;85:128-135. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.11.117.

24. Xiang H., Song Y., Wang Y., Fu W., Xiao N. A novel NIR fluorescent probe for in situ visualizing Fe(II) and its application in drug-induced liver/kidney injury. *Materials Advances*. 2024;5(13):5624-5631. DOI: 10.1039/d4ma00361f.

25. Akakpo J.Y., Ramachandran A., Orhan H., Curry S.C., Rumack B.H., Jaeschke H. 4-Methylpyrazole protects against acetaminophen-induced acute kidney injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2020;409:115317. DOI: 10.1016/j.taap.2020.115317.

26. Zeng X., Chen J., Yu S., Liu Z., Ma M. A highly selective and sensitive “turn-on” fluorescent probe for Fe^{2+} and its applications. *Journal of Luminescence*. 2022;250:119069. DOI: 10.1016/j.jlumin.2022.119069.

27. Wu L., Liu J., Tian X., Groleau R.R., Bull S.D., Li P., et al. Fluorescent probe for the imaging of superoxide and peroxynitrite during drug-induced liver injury. *Chemical Science*. 2021;12(11):3921-3928. DOI: 10.1039/d0sc05937d.

28. Guengerich F.P. Cytochrome P450 2E1 and its roles in disease. *Chemico-Biological Interactions*. 2020;322:109056. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109056.

29. Begriche K., Penhoat C., Bernabeu-Gentey P., Massart J., Fromenty B. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in obesity and nonalcoholic fatty liver disease: a critical review. *Livers*. 2023;3(1):33-53. DOI: 10.3390/livers3010003.

30. Kalsi S.S., Wood D.M., Waring W.S., Dargan P.I. Does cytochrome P450 liver isoenzyme induction increase the risk of liver toxicity after paracetamol overdose? *Open Access Emergency Medicine.* 2011;3:69-76. DOI: 10.2147/oaem.S24962.

31. Marto N., Morello J., Antunes A.M.M., Azeredo S., Monteiro E.C., Pereira S.A. A simple method to measure sulfonation in man using paracetamol as probe drug. *Scientific Reports.* 2021;11:9036. DOI: 10.1038/s41598-021-88393-3.

32. Sharifi-Rigi A., Heidarian E., Amini S.A. Protective and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic leaf extract of *Origanum vulgare* on oxidative stress, *TNF-α* gene expression and liver histological changes in paraquat-induced hepatotoxicity in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry.* 2018;125(1):56-63. DOI: 10.1080/13813455.2018.1437186.

33. Park C.H., Lee A.Y., Kim J.H., Seong S.H., Jang G.Y., Cho E.J., et al. Protective effect of safflower seed on cisplatin-induced renal damage in mice *via* oxidative stress and apoptosis-mediated pathways. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2018;46(1):157-174. DOI: 10.1142/s0192415x1850009x.

34. Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016;5:e47. DOI: 10.1017/jns.2016.41.

35. Tsai M.S., Chien C.C., Lin T.H., Liu C.-C., Liu R.H., Su H.-L., et al. Galangin prevents acute hepatorenal toxicity in novel propacetamol-induced acetaminophen-overdosed mice. *Journal of Medicinal Food*. 2015;18(11):1187-1197. DOI: 10.1089/jmf.2014.3328.

36. Zhu J., Wang Q., Li H., Zhang H., Zhu Y., Omari-Siaw E., et al. Galangin-loaded, liver targeting liposomes: optimization and hepatoprotective efficacy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018;46:339-347. DOI: 10.1016/j.jddst.2018.05.034.

37. Huang Y.-C., Tsai M.-S., Hsieh P.-C., Shih J.-H., Wang T.-S., Wang Y.-C., et al. Galangin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammation and cell death in mice through inhibition of ERK and NF-kappaB signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2017;329:128-139. DOI: 10.1016/j.taap.2017.05.034.

38. Alruhaimi R.S., Ahmeda A.F., Hussein O.E., Alotaibi M.F., Germoush M.O., Elgebaly H.A., et al. Galangin attenuates chlorpyrifos-induced kidney injury by mitigating oxidative stress and inflammation and upregulating Nrf2 and farnesoid-X-receptor in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2024;110:104542. DOI: 10.1016/j.etap.2024.104542.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Azin Delavar,
M. Sc., Assistant,
Department of Chemistry,
Islamic Azad University,
Imam Ali Complex, Moazen Blvd., Karaj,
3149968111, Iran,
delavar.azi18@gmail.com
https://orcid.org/0009-0004-7841-6636

Somayeh Shahami,
M. Sc., Assistant,
Department of Chemistry,
Islamic Azad University,
Imam Ali Complex, Moazen Blvd., Karaj,
3149968111, Iran,
s.shahami1@gmail.com
https://orcid.org/0009-0007-9340-183X

Ali Sobhanian,
Dr. Sci. (Pharmacy), Associate Professor,
Department of Pharmaceutical Sciences,
Islamic Azad University,
Zargandeh, Dr. Shariati St., Tehran,
1949635881, Iran,
✉ s.alisobhanian@gmail.com
https://orcid.org/0009-0004-5348-080X

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Делавар Азин,
магистр, ассистент,
Исламский университет Азад,
филиал в г. Карадже, химический факультет,
3149968111, г. Карадж, Бульвар Моазин,
Комплекс Имама Али, Иран,
delavar.azi18@gmail.com
https://orcid.org/0009-0004-7841-6636

Шахами Сомайех,
магистр, ассистент,
Исламский университет Азад,
филиал в г. Карадже, химический факультет,
3149968111, г. Карадж, Бульвар Моазин,
Комплекс Имама Али, Иран,
s.shahami1@gmail.com
https://orcid.org/0009-0007-9340-183X

Собханян Али,
д.фарм.н., доцент,
Исламский университет Азад,
филиал медицинских наук в г. Тегеране,
1936893813, г. Тегеран, ул. доктора Шариати,
Зарганде, Иран,
✉ s.alisobhanian@gmail.com
https://orcid.org/0009-0004-5348-080X

Abbas Ahmadi,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Department of Chemistry,
Islamic Azad University,
Imam Ali Complex, Moazen Blvd., Karaj,
3149968111, Iran,
abbasahmadi3957@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-4813-2876

Mehrdad Roghani,
Dr. Sci. (Physiology), Professor,
Neurophysiology Research Center,
Shahed University,
1471, North Kargar Ave., Tehran,
3319118651, Iran,
mehjour@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0002-9209-8484

Ахмади Аббас,
д.х.н., профессор,
Исламский университет Азад,
филиал в г. Карадже, химический факультет,
3149968111, г. Карадж, Бульвар Моазин,
Комплекс Имама Али, Иран,
abbasahmadi3957@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-4813-2876

Рогани Мехрдад,
д.м.н., профессор,
Центр нейрофизиологических исследований,
Университет Шахед,
3319118651, г. Тегеран, пр. Северный
Каргар, 1471, Иран,
mehjour@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0002-9209-8484

Contribution of the authors

Azin Delavar – data curation, formal analysis, investigation, resources, software.
Somayeh Shahami – data curation, formal analysis, investigation, resources, software.
Ali Sobhanian – conceptualization, methodology, investigation, project administration, supervision, validation, visualization, writing – original draft, editing.
Abbas Ahmadi – conceptualization, methodology, investigation, supervision, validation, visualization, writing – original draft, editing.
Mehrdad Roghani – conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, software, supervision, validation, visualization, writing – original draft, editing.

Вклад авторов

А. Делавар – курирование данных, формальный анализ, проведение исследования, предоставление ресурсов, разработка программного обеспечения.
С. Шахами – курирование данных, формальный анализ, проведение исследования, предоставление ресурсов, разработка программного обеспечения.
А. Собханян – разработка концепции, разработка методологии, проведение исследования, административное руководство исследовательским проектом, научное руководство, валидация результатов, визуализация, написание черновика рукописи, редактирование рукописи.
А. Ахмади – разработка концепции, разработка методологии, проведение исследования, научное руководство, валидация результатов, визуализация, написание черновика рукописи, редактирование рукописи.
М. Рогани – разработка концепции, разработка методологии, формальный анилиз, проведение исследования, разработка программного обеспечения, научное руководство, валидация результатов, визуализация, написание черновика рукописи, редактирование рукописи.

Conflict of interest

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

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Information about the article

The article was submitted 28.12.2024.
Approved after reviewing 16.03.2025
Accepted for publication 31.05.2025.

Информация о статье

Поступила в редакцию 28.12.2024.
Одобрена после рецензирования 16.03.2025
Принята к публикации 31.05.2025.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 637.144.5
EDN: IOICNI
DOI: 10.21285/achb.979

Биохимические свойства коммерческих препаратов рекомбинантного химозина

А.В. Гришкова*,,***✉, А.Н. Белов*, А.Д. Коваль*, Ю.Г. Стурова***, О.Н. Мусина*****

**Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Барнаул, Российская Федерация*
***Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Российская Федерация*
****Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Российская Федерация*

Аннотация. *Целью проведенного исследования являлось изучение биохимических свойств коммерческих образцов рекомбинантного химозина, представленных на российском рынке. Одним из важнейших элементов технологии производства натуральных сыров является преобразование молочной смеси в сгусток под действием сычужного фермента или других молокосвертывающих ферментных препаратов. Свертывание молока может осуществляться многими протеазами, способными обеспечить гидролитическое расщепление к-казеина. При этом для получения продукта высокого качества важно учитывать особенности биохимических свойств молокосвертывающего фермента, от которых будут зависеть протеолитические процессы, протекающие в сыре от момента выработки до его созревания. В ходе работы исследовали влияние ионов водорода, кальция и температуры на специфическую (молокосвертывающую) активность ферментных препаратов. Определение активности проводили согласно отраслевому стандарту 10288-2001 «Препараты ферментные молокосвертывающие». Неспецифическую (протеолитическую) активность определяли стандартным методом по Е.Д. Каверзневой, модифицированным для лабораторных исследований молокосвертывающих ферментных препаратов. Согласно полученным результатам, препараты исследуемых коммерческих образцов рекомбинантного химозина по биохимическим свойствам близки к отраслевому контрольному образцу (эталону) сычужного фермента, что позволяет применять их в производстве сыров с высокой температурой второго нагревания, для которых по классической технологии применяется сычужный фермент. В России генно-инженерные химозины не производят. В связи с этим актуальными являются исследования по разработке технологий получения препаратов отечественного рекомбинантного химозина, которые проводятся сотрудниками Сибирского научно-исследовательского института сыроделия совместно с Государственным научным центром вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.*

Ключевые слова: *молокосвертывающие ферменты, рекомбинантный химозин, сыр, коагуляция, молокосвертывающая активность, протеолитическая активность, термостабильность, температурный оптимум*

Финансирование. *Работа выполнена в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-00042-24-00, номер темы FZMM-2024-0003).*

Для цитирования: Гришкова А.В., Белов А.Н, Коваль А.Д., Стурова Ю.Г., Мусина О.Н. Биохимические свойства коммерческих препаратов рекомбинантного химозина // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 178–187. DOI: 10.21285/achb.979. EDN: IOICNI.

© Гришкова А.В., Белов А.Н, Коваль А.Д., Стурова Ю.Г., Мусина О.Н., 2025

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Biochemical properties of commercial recombinant chymosin preparations

Anastasiya V. Grishkova*,,***✉, Alexander N. Belov*, Anatoliy D. Koval*, Yuliay G. Sturova***, Olga N. Musina*****

**Federal Altai Scientific Center for Agrobiotechnology, Barnaul, Russian Federation*
***Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation*
****Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russian Federation*

Abstract. *This study investigates the biochemical properties of commercial recombinant chymosin samples available on the Russian market. One of the most critical steps in the production of natural cheese is the coagulation of milk into a curd under the action of rennet or other milk-clotting enzymes. While milk coagulation can be induced by various proteases capable of hydrolyzing к-casein, the quality of the final product significantly depends on the biochemical properties of the enzyme. These properties influence the proteolytic processes occurring in the cheese from production to maturation. In this work, we examined the effects of hydrogen ions, calcium, and temperature on the specific (milk-clotting) activity of the enzyme preparations. The activity was determined in accordance with the industry standard OST 10288-2001 ("Milk-Clotting Enzyme Preparations"). The non-specific (proteolytic) activity was measured using a standard method of E.D. Kaverzneva, adapted for laboratory studies of milk-clotting enzymes. The results demonstrated that the biochemical properties of the tested commercial recombinant chymosin samples were equivalent to those of the industry reference standard for rennet. This finding supports their suitability for producing cheeses with a high second heating temperature, for which the conventional technology uses rennet. In Russia, the production of genetically engineered chymosins is not currently undertaken. Consequently, the development of domestic production technologies for recombinant chymosin remains highly relevant. Such studies are being conducted by the Siberian Research Institute of Cheese Making in collaboration with the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" (Rospotrebnadzor).*

Keywords: *milk-clotting enzymes, recombinant chymosin, cheese, coagulation, milk-clotting activity, proteolytic activity, thermostability, temperature optimum*

Funding. *The Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation supported this work (no. 075-00042-24-00, topic no. FZMM-2024-0003).*

For citation: Grishkova A.V., Belov A.N., Koval A.D., Sturova Yu.G., Musina O.N. Biochemical properties of commercial recombinant chymosin preparations. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2): 178-187. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.979. EDN: IOICNI.

ВВЕДЕНИЕ

Влияние сычужного фермента и прочих коагулянтов молока различного происхождения на молекулу к-казеина является существенным фактором при получении сгустка из молочной смеси при производстве сыра [1, 2]. Важным элементом технологии производства полутвердых сыров с высокой и низкой температурой второго нагревания является процесс созревания, во время которого происходит гидролитический распад белковых компонентов изготавливаемого продукта при совокупном воздействии протеаз заквасочной микрофлоры и молокосвертывающих ферментных препаратов [3–5].

Процесс свертывания молочной смеси может производиться под воздействием большого количества протеолитических ферментов, обладающих способностью гидролизовать к-казеин. Технологи, применяя при выработке сыра конкретные молокосвертывающие ферментные препараты (МФП), должны учитывать, что качество готового продукта напрямую зависит от биохимических свойств конкретного коагулянта. Последние, в свою очередь, должны соответствовать требованиям, предъявляемыми в сыроделии[1] [6–8]. В связи с этим выбор МФП, предлагаемых рынком, должен быть обоснованным и целесообразным с точки зрения производства продукта высокого качества.

Структура рынка молокосвертывающих ферментов претерпела значительные изменения за два десятилетия XXI в. Последние несколько лет превалирует реализация препаратов рекомбинантного химозина. В настоящее время протеолитические ферменты микробного синтеза и животного происхождения пользуются меньшим спросом у производителей сыра (рис. 1).

[1] Wilkinson M.G., Doolan I.A., Kilcawley K.N. Enzyme-modified cheese // Encyclopedia of dairy sciences / eds P.L.H. McSweeney, J.P. McNamara. Academic Press, 2022. P. 166–171. DOI: 10.1016/B978-0-12-818766-1.00260-9.

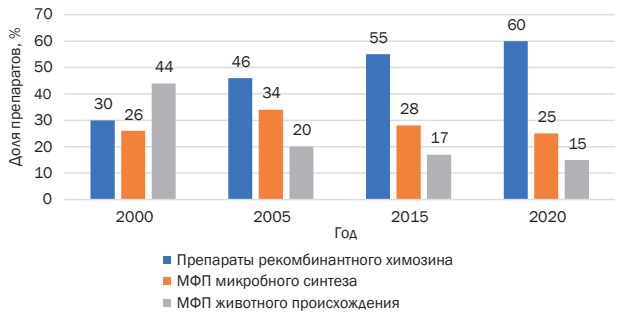


Рис. 1. Изменение соотношения молокосвертывающих ферментных препаратов различного происхождения в структуре мирового рынка

Fig. 1. Change in the ratio of milk-clotting enzyme preparations of various origins in the structure of the world market

По данным Американского фитопатологического общества, уже в 2000 г. в США свыше 90% твердых сыров производилось с рекомбинантным химозином. Преимущество данного химозина заключается в том, что его химическая структура аналогична натуральному, при этом он не содержит пепсина и других гидролаз, экстрагируемых из желудка при производстве МФП животного происхождения. Ко всему прочему, технология производства рекомбинантного химозина не зависит от времени года, исключает необходимость производить убой телят и вероятность передачи болезней крупного рогатого скота. Последнее являлось весомым аргументом для распространения рекомбинантного химозина в связи с возникновением эпидемии губчатой энцефалопатии (коровьего бешенства) в Великобритании и некоторых других странах Западной Европы в 1992 г. [9, 10].

Наиболее широко на рынке представлены такие коммерческие препараты рекомбинантного химозина, как CHY MAX (продуцент – *Aspergilus niger* var. *avamori*) производства Chr. Hansen (Дания) и Maxiren (продуцент – молочные дрожжи *Kluyveromyces lactis*) производства DSM Food Specialties (Нидерланды).

В биотехнологии производства рекомбинантного химозина изначально применялся ген-предшественник телячьего химозина – прохимозин, который клонировался в кольцевую молекулу ДНК некоторых бактерий (например, *Escherichia coli*), в результате чего в прокариотической клетке осуществлялась трансляция химозина[2] [11, 12].

Препараты рекомбинантного химозина могут иметь различия как по применяемым продуцентам, которыми являются, например, бактерии *Escherichia coli* K-12, дрожжи *Kluyveromyces lactis* или грибы *Aspergillus niger* var. *awamori*, так и по варианту внедренного гена. Известны три модификации молекулы химозина: A, B и C. Наибольшей активностью обладает химозин A, который может преобразовываться в химозин C. Химозин B синтезируется в наибольшем количестве. В натуральных МФП животного происхождения присутствуют все три модификации белка, в коммерческих препаратах рекомбинантного химозина это A или B, которые отличаются одной аминокислотой в позиции 286. Важно отметить, что в коммерческих рекомбинантных химозинах могут находиться другие варианты химозинов, которых нет в натуральном сычужном ферменте. Отсутствие примеси пепсина в препаратах рекомбинантного химозина позволяет производителям заявлять о своем продукте как о 100%-м химозине. Это объясняет стремительный рост его производства.

Безусловными преимуществами препаратов рекомбинантного химозина являются их низкая себестоимость, возможность производства больших объемов фермента и, что очень важно, низкая неспецифическая протеолитическая активность [13]. Препараты рекомбинантного химозина, как правило, имеют сертификаты кошерности, а сыры, произведенные с их применением, не запрещены для употребления в пищу вегетарианцами. В период до 1993 г. препараты рекомбинантного химозина были одобрены в 17 странах мира: Великобритании, Ирландии, Швеции, Швейцарии, Бельгии, Дании, Норвегии, Финляндии, Венгрии, Югославии, Польше, Израиле, Чили, Португалии, Южной Африке, Новой Зеландии, США.

Главная проблема широкого использования генно-инженерных химозинов, помимо отрицательного социального суждения, заключается в относительно небольшом опыте применения на практике (не таком широком, как для натуральных препаратов), а также сложности прогноза дальнейших последствий их использования. Документы Всемирной организации здравоохранения, находящиеся в свободном доступе и отражающие исследования по безопасности химозинов генно-инженерного происхождения, указывают на содержание минимальных (следовых) количеств отрезков ДНК продуцента уже после тщательной очистки, в которых определяется очень малая (на пределе чувствительности методов) активность ферментов не химозинового происхождения [14, 15].

Сыры, произведенные в большинстве стран с применением ферментных препаратов, имеют маркировку, свидетельствующую о том, что этот продукт не натуральный. В связи с этим традиционные сыры, которые имеют марку натуральности («Green»), не производятся с применением препаратов рекомбинантного химозина, так как с точки зрения законодательства такие коагулянты молока не являются натуральным сычужным ферментом.

На рынке Российской Федерации рекомбинантные молокосвертывающие препараты реализуются представителями производителей как «100%-й химозин, продуцируемый ферментацией». При этом производитель не раскрывает их генно-инженерного происхождения и дезинформирует несведущего потребителя, поскольку указывает не на происхождение коагулянтов, а на способ производства. В официальных документах Всемирной организации здравоохранения «рекомбинантными химозинами» называются препараты, продуцируемые «генетически-модифицированными организмами». При маркировке довольно популярных у российских сыродельных предприятий препаратов Maxiren и Chy-Max характеристика «генно-инженерный» не применяется, и нередко сыроделы не догадываются о том, какой препарат они используют.

[2] Ельчанинов В.В. Исследование молокосвертывающего фермента из сычугов северных оленей: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.04. Кемерово, 2006. 172 с.

Для применения зарубежных препаратов нужно знать их молокосвертывающую активность и ее соотношение с молокосвертывающей активностью препаратов отечественных. Так, 100000 условных российских единиц соответствуют примерно 950 международным молокосвертывающим единицам IMCU (International milk clotting units). Зачастую импортные препараты в два раза активнее российских, соответственно, у них меньший расход.

На пути массового применения «генно-инженерных» химозинов при производстве сыров возникает масса вопросов различного характера: как технологического, гигиено-токсикологического, так и этического, экономического и политического. Споры о безопасности продуктов, полученных с применением таких методов, начались с появлением их на рынке и продолжаются в настоящее время [14].

В связи с вышесказанным целью проведенного исследования являлась оценка основных биохимических параметров коммерческих препаратов рекомбинантного химозина, значимых для регулирования процесса свертывания молочной смеси при выработке сыра.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все необходимые для выполнения работы исследования проводились в лаборатории биохимии молока и молочных продуктов отдела Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия Федерального Алтайского научного центра агробиотехнологий (г. Барнаул, Россия).

Для сравнения в качестве контрольного образца использовали «Отраслевой контрольный образец сычужного фермента» (ОКО СФ). Исследованы препараты рекомбинантного химозина: CHY-MAX (продуцент – *Aspergilus niger* var. *avamori*, Chr. Hansen, Дания) и Maxiren 1800 (продуцент – *Kluyveromyces marxianus* v. *lactis*, DSM Food Specialties, Нидерланды).

Все использованные в работе реактивы имели квалификацию «ч.д.а.» или «х.ч.».

Оценку молокосвертывающей активности проводили согласно ОСТ 10288-2001 «Препараты ферментные молокосвертывающие». Протеолитическую активность определяли стандартным методом по Е.Д. Каверзневой [16], модифицированным для лабораторных исследований молокосвертывающих ферментных препаратов.

Процедура определения молокосвертывающей активности была следующей. К 2,5 мл молока, прогретого при 35 °С не менее 5 мин, добавляли 0,2 мл исследуемого молокосвертывающего фермента и одновременно включали секундомер. Быстро перемешивали смесь стеклянной палочкой и регистрировали время появления первых хлопьев коагулята. Строили график зависимости продолжительности свертывания от pH молока.

Для исследования влияния pH молока на молокосвертывающую активность в пластиковые стаканы наливали молоко по 50 мл в каждый, доводили температуру до комнатной и титровали 1,0 М NaOH или 1,0 М HCl для получения 5 образцов со значениями pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 и 7,0.

С целью исследования влияния концентрации хлористого кальция на молокосвертывающую активность в мерные колбы объемом по 50 мл вносили 0,5 М раствор $CaCl_2$ для получения 6 образцов с конечной концентрацией внесенного хлористого кальция в молоке 0, 1, 2, 3, 4 и 5 мМ.

После прогревания 1%-х растворов сухих МФП в дистиллированной воде в течение 30 мин при температуре от 30 до 70 °С с интервалом в 5 °С определяли термостабильность МФП, проверяя динамику изменения их молокосвертывающей активности.

Температуру прогревания, при которой исследуемый МФП терял 20% молокосвертывающей активности и более от исходной, принимали за порог термоинактивации.

Для определения температурного оптимума (*T*-оптимума) молокосвертывающей активности после прогревания подготовленного субстрата при температуре от 30 до 60 °С с интервалом в 5 °С в течение 10 мин на водяной бане вносили 1%-й раствор сухих МФП и определяли молокосвертывающую активность.

Максимальное значение молокосвертывающей активности принимали за 100%. Порогом Т-оптимума считали температуру, при которой исследуемый МФП сохранял не менее 80%.

Обработка полученных в экспериментах данных проводилась стандартно, математическими и статистическими методами. Статистическую обработку полученных данных проводили на платформе программного ресурса Microsoft Excel.

В России генно-инженерные химозины не производят. В связи с этим исследования по разработке технологии получения препаратов отечественного рекомбинантного химозина, проведенные сотрудниками Сибирского научно-исследовательского института сыроделия Федерального Алтайского научного центра агробиотехнологий совместно с Государственным научным центром вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора [17] и представленные в данной статье, являются актуальными, а их применение имеет большую практическую значимость.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прежде всего при изучении биохимических свойств МФП рассматривают величину молокосвертывающей активности. Это специфическая реакция, в результате которой происходит разрыв пептидной связи Phe (105)-Met (106) в молекуле к-казеина. В результате этого процесса осуществляется свертывание молока и формирование молочного сгустка. Показатель молокосвертывающей активности является декларируемым, и производитель обязан указать его на товарной упаковке. Важно учитывать, что производитель устанавливает молокосвертывающую активность и рассчитывает дозировку МФП с использованием стандартизированного молочного субстрата. При этом на каждом конкретном сыродельном заводе физико-химические показатели молочной смеси могут отличаться и не совпадать с его показателями. Следствием данного факта могут быть отличия значений молокосвертывающей активности, то есть доза внесения молокосвертывающего фермента на единицу смеси будет отличаться от величины, рекомендуемой производителем коагулянта молока.

На первом этапе исследований молокосвертывающая и протеолетическая активность изученных образцов рекомбинантного химозина была определена при стандартных условиях. Результаты представлены в табл. 1 и на рис. 2.

Таблица 1. Молокосвертывающая и протеолетическая активность образцов ферментных препаратов

Table 1. Milk-clotting and proteolytic activity of enzyme preparation samples

Наименование препарата	Молокосвертывающая активность, у.е./г	Протеолетическая активность, ед. ОП
ОКО СФ	114290	0,184±0,02
Maxiren 1800	223463±1759	0,273±0,02
CHY-MAX	238853±3254	0,189±0,02

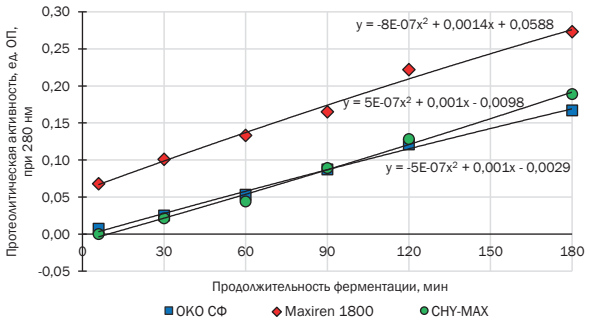


Рис. 2. Протеолитическая активность препаратов рекомбинантного химозина

Fig. 2. Proteolytic activity of recombinant chymosin preparations

Проведенные нами исследования показали, что препарат рекомбинантного химозина CHY-MAX (0,189 ед. ОП) имел протеолетическую активность, сопоставимую с таковой у ОКО СФ (0,184 ед. ОП). Низкая протеолетическая активность препарата CHY-MAX может быть объяснена высокой степенью очистки, которая в настоящее время достигается производителями. У препарата Maxiren 1800 протеолетическая активность была несколько выше (0,273 ед. ОП) (см. табл. 1, рис. 2).

Физико-химические показатели молочной смеси существенно влияют на величину молокосвертывающей активности МФП. По этой причине важно производить оценку параметра молокосвертывающей активности, учитывая влияние на него таких факторов, как pH, содержание ионов кальция, температура для максимально эффективного использования коагулянтов.

Способность эффективно осуществлять коагуляцию молочной смеси при значениях pH 6,5 на этапе внесения фермента – одно из главных требований к МФП при выработке сыра. Учитывая тот факт, что часть молокосвертывающего препарата всегда остается в сырном зерне, нужно понимать, какова активность коагулянта при значении pH около 5,5, которое характерно для сырной массы на этапе прессования, а также при pH около 5,0, то есть на пике развития микрофлоры в созревающих сырах.

Согласно результатам исследований, представленным в табл. 2 и на рис. 3, при приближении значений pH к 7,0 препараты рекомбинантного химозина инактивировались на 88–90%. При этом динамика изменения молокосвертывающей активности в изученном диапазоне отличалась. Препарат рекомбинантного химозина Maxiren 1800 сохранял более высокий уровень молокосвертывающей активности по сравнению с препаратом CHY-MAX.

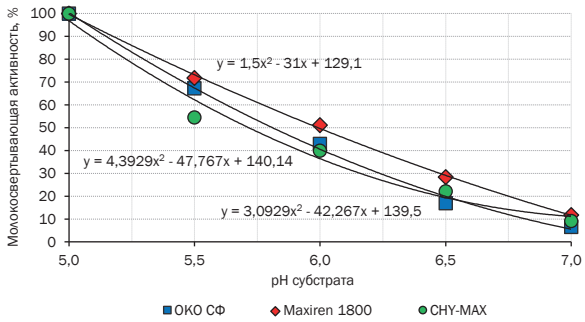


Рис. 3. Динамика изменения молокосвертывающей активности препаратов рекомбинантного химозина в зависимости от pH молока

Fig. 3. Change in the milk-clotting activity of recombinant chymosin preparations depending on the pH of milk

В России, согласно требованиям ТР ТС 033/2013, при выработке подавляющего количества сычужных сыров молоко подвергают пастеризации. В результате этого процесса происходит снижение количества несвязанных ионов кальция, что, в свою очередь, является причиной увеличения длительности сычужного свертывания пастеризованного молока. Чтобы не прибегать к увеличению количества вносимого коагулянта в качестве меры регулирования консистенции сыра в пастеризованное молоко вносят $CaCl_2$ из расчета 10–50 г/100 л. Реакция различных коагулянтов молока на увеличение количества вносимого хлористого кальция может отличаться. Следовательно, определение зависимости молокосвертывающей активности ферментного препарата от дозы вносимого в молочную смесь $CaCl_2$ является важной с точки зрения технологии сыроделия.

Получены данные о том, что с увеличением дозы вносимого $CaCl_2$ от 0 до 5 mM молокосвертывающая активность исследуемых препаратов возрастала. Наибольшую

Таблица 2. Влияние концентрации ионов водорода на молокосвертывающую активность препаратов рекомбинантного химозина

Table 2. Effect of hydrogen ions concentration on the milk-clotting activity of recombinant chymosin preparations

Наименование препарата	Молокосвертывающая активность, %, при различных значениях pH в субстрате				
	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
ОКО СФ	100	67,32±2,81	43,02±2,03	16,82±0,36	6,55±0,07
Maxiren 1800	100	71,74±4,54	50,91±0,01	28,31±1,19	11,63±0,31
CHY-MAX	100	54,55±0,01	37,50±0,01	24,00±0,01	9,14±0,09

Таблица 3. Влияние концентрации ионов кальция в молоке на молокосвертывающую активность препаратов рекомбинантного химозина

Table 3. Effect of calcium ions concentration in milk on the milk-clotting activity of recombinant chymosin preparations

Наименование препарата	Молокосвертывающая активность, %, при различной концентрации $CaCl_2$					
	0 mM	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM
ОКО СФ	100	139,23±1,85	184,92±3,27	236,66±0,01	277,58±11,38	314,2±5,50
Maxiren 1800	100	150,03±4,25	199,96±0,01	239,96±0,01	295,18±9,33	321,58±11,46
CHY-MAX	100	146,82±0,01	208,23±12,34	257,23±12,14	313,72±10,60	342,57±0,01

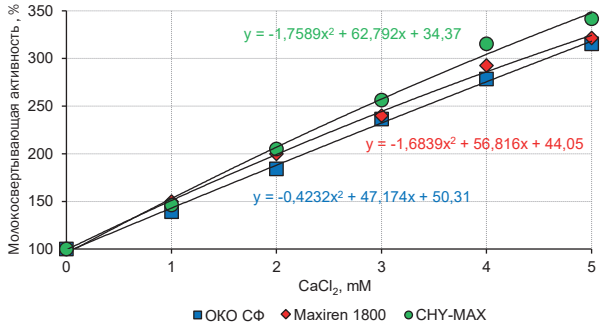


Рис. 4. Динамика изменения молокосвертывающей активности препаратов рекомбинантного химозина в зависимости от концентрации Ca^{2+}

Fig. 4. Change in the milk-clotting activity of recombinant chymosin preparations depending on Ca^{2+} concentration

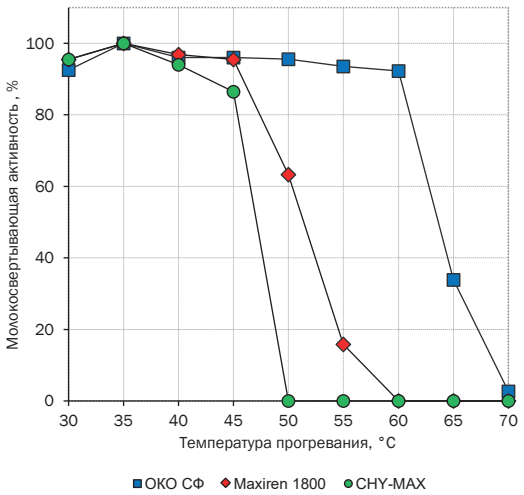


Рис. 5. Динамика изменения молокосвертывающей активности препаратов рекомбинантного химозина в зависимости от температуры инкубирования фермента

Fig. 5. Change in the milk-clotting activity of recombinant chymosin preparations depending on the enzyme incubation temperature

чувствительность при повышении содержания $CaCl_2$ в молоке на всех этапах исследования имел препарат рекомбинантного химозина CHY-MAX (табл. 3, рис. 4). Препарат Maxiren 1800 имел показатели, близкие к значениям ОКО СФ.

Термостабильность – это возможность фермента избегать денатурации (необратимых изменений белковой структуры) при критических значениях температуры окружающей среды. При созревании сыра термостабильность МФП является одним из важных факторов, влияющих на интенсивность и направленность происходящих в нем протеолитических процессов. Остатки МФП в сырной массе вызывают неспецифичный протеолиз, так как субстратами для них становятся α- и β-казеины [18, 19]. При производстве сыров с высокой температурой второго нагревания (52–58 °C) и длительными сроками хранения в основном применяют термолабильные МФП [19]. И напротив, для производства сыров с чеддеризацией и термомеханической обработкой сырной массы должны использоваться термостабильные ферменты, сохраняющие протеолитическую активность при действии высоких температур (60–70 °C) [20].

В проведенных исследованиях за порог термостабильности МФП принималось значение температуры прогревания, при котором фермент терял 20% и более от исходной молокосвертывающей активности. Результаты исследования термостабильности препаратов рекомбинантного химозина представлены в табл. 4 и на рис. 5.

Термостабильность образцов рекомбинантного химозина была различной: при 50 °C препарат Maxiren 1800, достигнув порога термостабильности, сохранял около 63% от исходной молокосвертывающей активности, а препарат CHY-MAX при такой же температуре уже почти полностью терял активность и показывал лишь 0,5% от первоначальных значений. При этом пороги термостабильности генно-инженерных химозинов были одинаковыми (50 °C) (см. табл. 4, рис. 5). Порог термостабильности ОКО СФ наступал при температуре 65 °C, при 70 °C препарат сохранял только 2,67% от максимальной молокосвертывающей активности.

Таблица 4. Термостабильность препаратов рекомбинантного химозина

Table 4. Thermal stability of recombinant chymosin preparations

Наименование препарата	Остаточная молокосвертывающая активность, %, при различной температуре прогревания								
	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C	60 °C	65 °C	70 °C
ОКО СФ	92,50±1,47	100	96,56±0,01	96,56±0,01	95,63±0,91	93,38±1,75	92,31±2,27	34,02±0,20	2,67±0,05
Maxiren 1800	98,70±2,55	100	100,00±2,55	93,80±0,01	63,34±1,79	15,93±0,45	3,25±0,19	–	–
CHY-MAX	95,07±1,86	100	94,12±0,01	86,49±0,01	0,54±0,01	–	–	–	–

Таблица 5. Влияние температуры субстрата на молокосвертывающую активность молокосвертывающего ферментного препарата

Table 5. Effect of substrate temperature on the milk-converting activity of a milk-clotting enzyme preparation

Наименование препарата	Молокосвертывающая активность, %, при различной температуре субстрата						
	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C	60 °C
ОКО СФ	38,6±1,5	62,2±1,8	74,1±0,9	86,4±3,2	92,1±0,5	100	100
Maxiren 1800	33,3±1,6	47,2±2,2	60,3±1,2	77,3±1,3	89,5±2,9	100	90,0±4,5
CHY-MAX	31,6±0,9	47,2±2,4	59,9±2,3	78,3±2,4	100	100	60,7±3,7

T-оптимум является одной их общих биохимических характеристик молокосвертывающих ферментов, которая позволяет оценить молокосвертывающую активность на основных технологических этапах выработки сыра, связанных с изменением температуры от момента свертывания молока до стадий прессования и посолки[2] [9]. У препаратов рекомбинантного химозина CHY-MAX и Maxiren 1800 в диапазоне температур от 30 до 45 °C наблюдалась одинаковая молокосвертывающая активность (табл. 5, рис. 6).

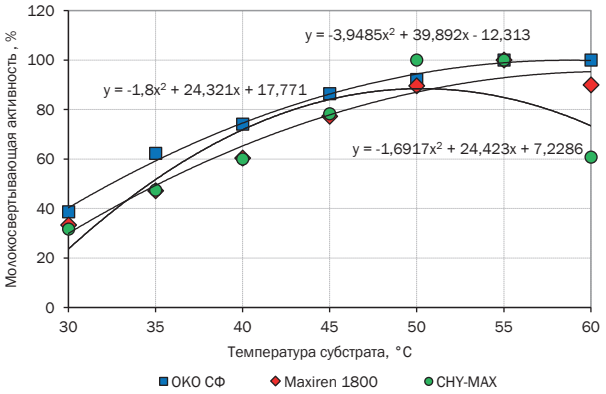


Рис. 6. Динамика изменения молокосвертывающей активности препаратов рекомбинантного химозина в зависимости от температуры субстрата

Fig. 6. Change in the milk-clotting activity of recombinant chymosin preparations depending on the substrate temperature

T-оптимум для CHY-MAX наступал при достижении 50 °C, максимальная активность сохранялась в интервале 50–55 °C. При температуре 60 °C молокосвертывающий фермент оказался за порогом *T*-оптимума, так как сохранял менее 80% (около 60,7%) от максимальной молокосвертывающей активности. *T*-оптимум для Maxiren 1800 наступал при достижении 55 °C, при температуре 60 °C молокосвертывающий фермент потерял только 10% активности, что коррелирует с более высокой термостабильностью этого варианта химозина. При этом препарат ОКО СФ сохранял высокую молокосвертывающую активность при максимальной температуре прогревания субстрата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Препарат рекомбинантного химозина CHY-MAX имел сопоставимую с ОКО СФ протеолетическую активность. У препарата Maxiren 1800 протеолетическая активность была несколько выше.

2. При pH 7,0 препараты рекомбинантного химозина инактивировались на 88–90%. Динамика изменения молокосвертывающей активности в диапазоне pH от 5,0 до 7,0 отличалась. Препарат рекомбинантного химозина Maxiren 1800 сохранял более высокий уровень молокосвертывающей активности по сравнению с препаратом CHY-MAX.

3. С увеличением дозы вносимого $CaCl_2$ с 0 до 5 mM молокосвертывающая активность исследуемых препаратов возрастала. Препарат рекомбинантного химозина CHY-MAX имел наибольшую чувствительность к увеличению концентрации ионов Ca^{2+}. Молокосвертывающая активность препарата Maxiren 1800 была близка к значениям молокосвертывающей активности ОКО СФ.

4. Термостабильность препаратов рекомбинантного химозина была различной: при 50 °C препарат Maxiren 1800, достигнув порога термостабильности, сохранял около 63% от исходной молокосвертывающей активности, а препарат CHY-MAX при такой же температуре уже почти полностью терял активность и показывал лишь 0,5% от первоначальных значений. При этом пороги термостабильности исследованных препаратов рекомбинантного химозина были одинаковыми (50 °C).

5. *T*-оптимум для CHY-MAX наступал при достижении 50 °C, для Maxiren 1800 – 55 °C. При температуре 60 °C CHY-MAX достиг порога *T*-оптимума (сохранил около 60% от максимального уровня молокосвертывающей активности), а Maxiren 1800 потерял только 10% активности. При температуре 50–55 °C значения молокосвертывающей активности препарата Maxiren 1800 были близки к значениям молокосвертывающей активности ОКО.

Качество готового продукта в значительной степени зависит от выбора применяемых при выработке сыра МФП. Правильный выбор фермента с необходимыми технологическими свойствами, из которых протеолитическая активность является одним из важнейших, поможет предприятиям производить продукцию высокого качества и увеличить выход сыра. Препараты исследуемых коммерческих образцов рекомбинантного химозина по биохимическим свойствам близки к ОКО СФ, что позволяет применять их в производстве сыров с высокой температурой второго нагревания, для которых по классической технологии применяется сычужный фермент.

В России генно-инженерные химозины не производятся. В связи с этим проведенные исследования по разработке технологии получения препаратов отечественного рекомбинантного химозина являются актуальными, а их применение имеет большую практическую значимость.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Мусина О.Н., Гришкова А.В., Просеков А.Ю. К вопросу о самообеспеченности страны молокосвертывающими ферментами // Молочная промышленность. 2024. N 1. С. 24–27. DOI: 10.21603/1019-8946-2024-1-10. EDN: KINKYI.

2. Свириденко Г.М. Требования к бактериальным заквасками для производства ферментируемых молочных продуктов // Сыроделие и маслоделие. 2014. N 4. С. 24–27. EDN: SJDTGT.

3. Абрамов Д.В., Мягконосов Д.С., Делицкая И.Н., Мордвинова В.А., Муничева Т.Э., Овчинникова Е.Г. Перспективы применения комплексных МФП для производства созревающих сычужных сыров // Сыроделие и маслоделие. 2019. N 1. С. 24–26. DOI: 10.31515/2073-4018-2019-1-24-26. EDN: YYIIWT.

4. Абрамов Д.В., Мягконосов Д.С., Мордвинова В.А., Делицкая И.Н., Овчинникова Е.Г. Современные тенденции рынка молокосвертывающих ферментных препаратов // Сыроделие и маслоделие. 2018. N 6. С. 7–11. EDN: YZKXZR.

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

6. Nestorovski T., Velkoska – Markovska L., Srbinovska S., Miskoska – Milevska E., Petanovska – Ilievska B., Popovski Z.T. Different approaches in analyzing chymosin purity // Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences. 2019. Vol. 73, no. 3. P. 24–29. DOI: 10.55302/JAFES19733024n.

7. Курбанова, М.Г., Бондарчук О.Н., Масленникова С.М. Практические аспекты гидролиза казеина молока эндопептидазами // Техника и технология пищевых производств. 2013. N 2. С. 34–39. EDN: QANQOF.

8. Илларионова Е.Е., Кручинин А.Г., Калугина Д.Н., Туровская С.Н. Исследование воздействия молокосвертывающих ферментов различного происхождения на формирование молочных сгустков // Пищевая промышленность. 2021. N 9. С. 27–29. DOI: 10.52653/PPI.2021.9.9.008. EDN: HPZWKT.

9. Кручинин А.Г., Илларионова Е.Е. Сравнение структурно-механических характеристик ферментированных молочных концентратов // Вестник КрасГАУ. 2022. N 3. С. 162–170. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-3-162-170. EDN: SNYSSA.

10. Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Chapoval A.I., Esina T.I., Elchaninov V.V. The effect of thioredoxin and prochymosin coexpression on the refolding of recombinant alpaca chymosin // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. Т. 27. N 4. С. 421–427. DOI: 10.18699/VJGB-23-50. EDN: CCPBRD.

11. Hayat S.M.G., Farahani N., Golichenari B., Sahebkar A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know // Current Pharmaceutical Design. 2018. Vol. 24, no. 6. P. 718–725. DOI: 10.2174/1381612824666180131121940.

12. Рудометов А.П., Беленькая С.В., Щербаков Д.Н., Балабова Д.В., Кригер А.В., Ельчанинов В.В. Исследование ферментативной стабильности жидких препаратов рекомбинантного химозина коровы (*Bos taurus taurus* L) // Сыроделие и маслоделие. 2017. N 6. С. 40–43. EDN: ZUDMCR.

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

14. Sankar P.L., Cho M.K. Engineering values into genetic engineering: a proposed analytic framework for scientific social responsibility // The American Journal of Bioethics. 2015. Vol. 15, no. 12. P. 18–24. DOI: 10.1080/15265161.2015.1104169.

15. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. Short communication: a comparative analysis of recombinant chymosins // Journal of Dairy Science. 2012. Vol. 95, no. 2. P. 609–613. DOI: 10.3168/jds.2011-4445.

16. Каверзнева Е.Д. Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеаз // Прикладная биохимия и микробиология. 1971. Т. 7. N 2. С. 225–228.

17. Пат. № 2670071, Российская Федерация, МПК C12N 15/00. Рекомбинантная плазмида pET21a-ProChym, обеспечивающая синтез химерного белка прохимозина B Bos taurus, и штамм *Eschrichia coli* BL21(DE3)pLysE pET21a-ProChym – продуцент химерного белка прохимозина B Bos taurus / Д.Н. Щербаков, А.П. Рудометов, В.В. Ельчанинов, С.В. Беленькая, А.В. Кригер, А.А. Ильичев. Заявл. 03.07.2017; опубл. 17.10.2018. Бюл. № 29.

18. Taheri-Kafrani A., Kharazmi S., Nasrollahzadeh M., Soozanipour A., Ejeian F., Etedali P., et al. Recent developments in enzyme immobilization technology for high-throughput processing in food industries // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2021. Vol. 61, no. 19. P. 3160–3196. DOI: 10.1080/10408398.2020.1793726.

19. Лепилкина О.В., Григорьева А.И. Ферментативный протеолиз при преобразовании молока в сыр // Пищевые системы. 2023. Т. 6. N 1. С. 36–45. DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-36-45. EDN: MYSJFF.

20. Димитров В.Г. Особенности производства сыров типа «Моцарелла» // Сыроделие и маслоделие. 2016. N 2. С. 34–35. EDN: VQDGUN.

REFERENCES

1. Musina O.N., Grishkova A.V., Prosekov A.Yu. Domestic self-sufficiency in milk-converting enzymes. *Dairy Industry*. 2024;1:24-27. (In Russian). DOI: 10.21603/1019-8946-2024-1-10. EDN: KINKYI.

2. Sviridenko G.M. Requirements to the bacterial starters for fermented milk products manufacturing. *Cheesemaking and buttermaking*. 2014;4:24-27. (In Russian). EDN: SJDTGT.

3. Abramov D.V., Myagkonosov D.S., Delitskaya I.N., Mordvinova V.A., Municheva T.E., Ovchinnikova E.G. Perspectives of using complex milk-clotting enzyme preparations for ripening rennet cheeses production. *Cheesemaking and buttermaking*. 2019;1:24-26. (In Russian). DOI: 10.31515/2073-4018-2019-1-24-26. EDN: YYIIWT.

4. Abramov D.V., Myagkonosov D.S., Mordvinova V.A., Delitskaya I.N., Ovchinnikova E.G. Current market trends of milk-coagulating enzyme preparations. *Cheesemaking and buttermaking*. 2018;6:7-11. (In Russian). EDN: YZKXZR.

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

6. Nestorovski T., Velkoska – Markovska L., Srbinovska S., Miskoska – Milevska E., Petanovska – Ilievska B., Popovski Z.T. Different approaches in analyzing chymosin purity. *Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences*. 2019;73(3):24-29. DOI: 10.55302/JAFES19733024n.

7. Kurbanova M.G., Bondarchuk O.N., Maslennikova S.M. Practical aspects of hydrolysis of milk casein by endopeptidases. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2013;2:34-39. (In Russian). EDN: QANQOF.

8. Illarionova E.E., Kruchinin A.G., Kalugina D.N., Turovskaya S.N. The research on the effect of the milk-clotting ferments of different origin on the milk clots formation. *Food Industry*. 2021;9:27-29. (In Russian). DOI: 10.52653/PPI.2021.9.9.008. EDN: HPZWKT.

9. Kruchinin A.G., Illarionova E.E. Fermented milk concentrates structural and mechanical characteristics comparison. *Bulletin of KSAU*. 2022;3:162-170. (In Russian). DOI: 10.36718/1819-4036-2022-3-162-170. EDN: SNYSSA.

10. Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Chapoval A.I., Esina T.I., Elchaninov V.V. The effect of thioredoxin and prochymosin coexpression on the refolding of recombinant alpaca chymosin. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(4):421-427. DOI: 10.18699/VJGB-23-50.EDN: CCPBRD.

11. Hayat S.M.G., Farahani N., Golichenari B., Sahebkar A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know. *Current Pharmaceutical Design*. 2018;24(6):718-725. DOI: 10.2174/1381612824666180131121940.

12. Rudometov A.P., Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Krieger A.V., Elchaninov V.V. Study of enzymatic stability of the liquid preparations of the recombinant bovine (*Bos taurus taurus* L.) chymosin. *Cheesemaking and buttermaking*. 2017;6:40-43. (In Russian). EDN: ZUDMCR.

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

14. Sankar P.L., Cho M.K. Engineering values into genetic engineering: a proposed analytic framework for scientific social responsibility. *The American Journal of Bioethics*. 2015;15(12):18-24. DOI: 10.1080/15265161.2015.1104169.

15. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. Short communication: a comparative analysis of recombinant chymosins. *Journal of Dairy Science*. 2012;95(2):609-613. DOI: 10.3168/jds.2011-4445.

16. Kaverzneva E.D. Standard method for determining proteolytic activity for complex protease preparations. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 1971;7(2):225-228. (In Russian).

17. Shcherbakov D.N., Rudometov A.P., Elchaninov V.V., Belenkaya S.V., Kriger A.V., Ilichev A.A. *pET21a-ProChym recombinate plasmid, providing synthesis of chemeric B Bos taurus proximosin protein, as well as Escherichia coli BL21(DE3)pLysE pET21a-ProChym – producer of chemeric B Bos taurus proximosin protein*. Patent RF, no. 2670071; 2018. (In Russian).

18. Taheri-Kafrani A., Kharazmi S., Nasrollahzadeh M., Soozanipour A., Ejeian F., Etedali P., et al. Recent developments in enzyme immobilization technology for high-throughput processing in food industries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021;61(19):3160-3196. DOI: 10.1080/10408398.2020.1793726.

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

20. Dimitrov B.G. Special issues of “Mozarella” type cheeses manufacturing. *Cheesemaking and buttermaking*. 2016;2:34-35. (In Russian). EDN: VQDGUN.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Гришкова Анастасия Викторовна,
к.т.н., доцент,
старший научный сотрудник,
Федеральный Алтайский научный
центр агробиотехнологий,
656016, г. Барнаул, ул. Советской армии, 66,
Российская Федерация,
доцент,
Алтайский государственный
медицинский университет,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40,
Российская Федерация,
старший научный сотрудник,
Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
✉ anastasiya-kriger@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0003-1117-0489

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anastasiya V. Grishkova,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Senior Researcher,
Federal Altai Scientific
Center for Agrobiotechnology,
66, Sovetskoi Armii St., Barnaul, 656016,
Russian Federation,
Associate Professor,
Altai State Medical University,
40, Lenin Ave., Barnaul, 656038,
Russian Federation,
Senior Researcher,
Polzunov Altai State Technical University,
46, Lenin Ave., Barnaul, 656038,
Russian Federation,
✉ anastasiya-kriger@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0003-1117-0489

Белов Александр Николаевич,
к.т.н., ведущий научный сотрудник,
Федеральный Алтайский научный
центр агробиотехнологий,
656016, г. Барнаул, ул. Советской армии, 66,
Российская Федерация,
beloffan@yandex.ru,
https://orcid.org/0000-0003-4045-2493

Коваль Анатолий Дмитриевич,
к.т.н., ведущий научный сотрудник,
Федеральный Алтайский научный
центр агробиотехнологий,
656016, г. Барнаул, ул. Советской армии, 66,
Российская Федерация,
anatokoval@yandex.ru,
https://orcid.org/0000-0001-7832-7159

Стурова Юлия Геннадьевна,
к.т.н., доцент, старший научный сотрудник,
Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
y_sturova@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-4492-6628

Мусина Ольга Николаевна,
д.т.н., доцент, главный научный сотрудник,
Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
musinaolga@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-4938-8136

Alexander N. Belov,
Cand. Sci. (Engineering), Leading Researcher,
Federal Altai Scientific
Center for Agrobiotechnology,
66, Sovetskoi Armii St., Barnaul, 656016,
Russian Federation,
beloffan@yandex.ru,
https://orcid.org/0000-0003-4045-2493

Anatoliy D. Koval,
Cand. Sci. (Engineering), Leading Researcher,
Federal Altai Scientific
Center for Agrobiotechnology,
66, Sovetskoi Armyii St., Barnaul, 656016,
Russian Federation,
anatokoval@yandex.ru,
https://orcid.org/0000-0001-7832-7159

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

Olga N. Musina,
Dr. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Chief Researcher,
Polzunov Altai State Technical University,
46, Lenin Ave., Barnaul, 656038,
Russian Federation,
musinaolga@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-4938-8136

Вклад авторов

А.В. Гришкова – разработка концепции, разработка методологии, формальный анализ, проведение исследования, валидация результатов, визуализация, написание черновика рукописи.
А.Н. Белов – научное руководство, валидация результатов.
А.Д. Коваль – валидация результатов, написание черновика рукописи.
Ю.Г. Стурова – формальный анализ, валидация результатов, визуализация, редактирование рукописи.
О.Н. Мусина – получение финансирования.

Contribution of the authors

Anastasiya V. Grishkova – conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, validation, visualization, writing – original draft.
Alexander N. Belov – supervision, validation.
Anatoliy D. Koval – validation, writing – original draft.
Yuliay G. Sturova – formal analysis, validation, visualization, editing.
Olga N. Musina – funding acquisition.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

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 18.12.2024
Одобрена после рецензирования 03.03.2025.
Принята к публикации 31.05.2025.

Information about the article

The article was submitted 18.12.2024
Approved after reviewing 03.03.2025.
Accepted for publication 31.05.2025.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 661.728
EDN: WYMTGP
DOI: 10.21285/achb.970

Термическая этерификация полисахаридов соевой шелухи лимонной кислотой

С.Н. Евстафьев, Е.С. Фомина✉, Н.П. Тигунцева

Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. *Целью исследования являлось изучение эффективности термической этерификации полисахаридов шелухи сои лимонной кислотой и влияния ее на механические характеристики прессованной шелухи. Исследования термообработки смеси шелухи и лимонной кислоты выполнялись в интервале температур 110–170 °С без использования растворителей и катализаторов. Продолжительность термообработки варьировалась от 30 до 180 мин. В ходе работы было установлено, что процесс сопровождается гидролизом полисахаридов шелухи и их этерификацией во всем исследованном интервале температур. Основными продуктами термообработки являются модифицированная шелуха и биомасла. В составе биомасел в преобладающих количествах присутствуют продукты превращения лимонной кислоты: на их долю приходится от 55 до 82%. Низкомолекулярные продукты превращения полисахаридов шелухи представлены фурановыми соединениями. Протекание процесса этерификации подтверждено результатами исследования модифицированной шелухи методами инфракрасной спектроскопии и кондуктометрического титрования. Также изучена динамика накопления сложноэфирных связей в биомассе шелухи в зависимости от температуры и продолжительности термообработки. Установлено, что степень сшивки полимерных цепочек целлюлозы увеличивается с повышением температуры и продолжительности термообработки. Сравнительные испытания образцов прессованной исходной и модифицированной шелухи показали улучшение их механических свойств после термообработки с лимонной кислотой. Выявлено повышение прочности прессовок в 1,2 раза и жесткости в 2,5 раза. Представленные результаты являются экспериментальным подтверждением перспективности процесса этерификации шелухи сои лимонной кислотой при использовании ее в качестве наполнителя для производства композитных материалов.*

Ключевые слова: *соевая шелуха, лимонная кислота, этерификация, биомасло, модификация*

Для цитирования: Евстафьев С.Н., Фомина Е.С., Тигунцева Н.П. Термическая этерификация полисахаридов соевой шелухи лимонной кислотой // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 188–195. DOI: 10.21285/achb.970. EDN: WYMTGP.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Thermal esterification of soybean husk polysaccharides with citric acid

Sergei N. Evstaf'ev, Elena S. Fomina✉, Nadezhda P. Tiguntceva

Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. *The study was aimed at analyzing the efficiency of thermal esterification of soybean husk polysaccharides with citric acid and its effect on the mechanical characteristics of compressed husks. The thermal treatment of a mixture of husks and citric acid was studied within the temperature range of 110–170 °C without the use of solvents and catalysts. The duration of thermal treatment varied from 30 to 180 min. This process was found to be accompanied by the hydrolysis of husk polysaccharides and their esterification within the analyzed*

© Евстафьев С.Н., Фомина Е.С., Тигунцева Н.П., 2025

temperature range. The main products of thermal treatment are modified husks and bio-oils. The bio-oils contain predominantly the products of citric acid transformation (55 to 82%). The low-molecular-weight transformation products of husk polysaccharides are represented by furan compounds. The process of esterification was confirmed by the results of studying modified husks via infrared spectroscopy and conductometric titration. The accumulation dynamics of ester linkages in husk biomass were also analyzed in relation to temperature and thermal treatment duration. The cross-linking degree of cellulose polymer chains was found to increase with increasing temperature and thermal treatment duration. Comparative tests of the original compressed husk samples and the modified husks revealed an improvement in their mechanical properties following thermal treatment in the presence of citric acid. A 1.2-fold strength increase and a 2.5-fold stiffness increase were observed. The presented results experimentally confirm the potential of esterification of soybean husks with citric acid, with their use as a filler in the production of composite materials.

Keywords: *soybean husk, citric acid, esterification, bio-oil, modification*

For citation: Evstaf'ev S.N., Fomina E.S., Tiguntceva N.P. Thermal esterification of soybean husk polysaccharides with citric acid. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2):188-195. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.970. EDN: WYMTGP.

ВВЕДЕНИЕ

Соевая шелуха является побочным продуктом производства соевого масла с выходом около 5% от общего объема перерабатываемых соевых бобов. В настоящее время лишь малая часть шелухи находит применение в качестве корма для животных [1, 2]. Учитывая, что производство соевого масла в мире ежегодно растет [3], а весь объем производимого при этом побочного продукта не потребляется, поиск новых направлений использования соевого шелухи становится актуальным.

Шелуха сои – это лигноцеллюлозный материал с высоким содержанием полисахаридов, представленных преимущественно целлюлозой [4]. Кроме того, в состав шелухи входят гемицеллюлозы, пектин, белки, жиры и лигнин [5]. Благодаря относительно высокому содержанию полисахаридов шелуха может быть рекомендована для использования в качестве наполнителя при создании композитных материалов.

Исследования, посвященные изучению возможности использования соевой шелухи в производстве композитных материалов, крайне немногочисленны [3, 4, 6]. На целесообразность применения ее при производстве композитов на основе крахмала, а также для получения крахмальных пен и пленок указывают авторы работ [7–9]. В качестве недостатков композитов, полученных с использованием шелухи сои, отмечают их склонность к поглощению влаги и низкую прочность, которые обусловлены в первую очередь гидрофильностью целлюлозы и слабой межфазной связью в композитах [10]. Для решения этих проблем предлагаются различные методы модификации полисахаридов. Одним из таких методов является химическая сшивка, при которой сшивающий агент реагирует с полисахаридами с образованием межмолекулярных и/или внутримолекулярных связей. Наиболее распространенными сшивающими агентами для природных полимерных материалов являются поликарбоновые кислоты: щавелевая, лимонная, малеиновая, янтарная [11–14]. Установлено, что химическая сшивка способствует повышению гидрофобности композитов, а также обеспечивает их стойкость к термическому и механическому воздействию [15–17].

Значительная часть исследований, посвященных процессам химической модификации с использованием поликарбоновых кислот, была выполнена на образцах очищенной целлюлозы. Целью проведенного исследования являлось изучение эффективности термической этерификации полисахаридов шелухи сои лимонной кислотой и влияния ее на механические характеристики прессованной шелухи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовалась шелуха сои, предоставленная ООО «Янта» (г. Иркутск, Россия). Лимонная кислота была приобретена в компании АО «Химреактив».

Шелуху предварительно измельчали на мельнице ЛМТ-1 (ООО «Плаун», Россия) до крупности частиц менее 1 мм. Для удаления белков шелуху обрабатывали 4%-м раствором гидроксида натрия при температуре 60 °С в течение 1 ч. Соотношение шелухи и раствора гидроксида натрия составляло 1:10, pH = 9–11. После обработки шелуху отделяли фильтрованием на бумажном фильтре, промывали водой до нейтрального значения pH фильтрата и сушили при 105 °С.

Компонентный состав шелухи определяли с использованием общепринятых аналитических методов химии древесины[1], содержание белков – методом Кьельдаля.

Термическую этерификацию полисахаридов шелухи осуществляли лимонной кислотой без использования катализаторов и растворителей при атмосферном давлении. Кислоту предварительно растворяли в воде при нагревании до 80–90 °С с получением 70%-го раствора. Навеску шелухи добавляли в раствор кислоты, тщательно перемешивали для равномерного диспергирования и сушили при 60 °С в течение суток. На основании предварительных опытов массовое соотношение шелухи к кислоте составляло 1,6:1,0. Приготовленную смесь помещали в стеклянный стакан и нагревали в сушильном шкафу при температуре опыта в течение выбранного времени (30, 60, 120 и 180 мин) при периодическом перемешивании. Эксперимент проводили при 110, 130, 150 и 170 °С, то есть при температурах ниже и выше температуры плавления лимонной кислоты (152 °С). После термообработки охлажденную реакционную смесь

[1] Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: учеб. пособие. М.: Экология, 1991. 320 с.

исчерпывающе экстрагировали ацетоном при комнатной температуре. После удаления растворителя получали биомасло в виде коричневой вязкой жидкости. Для удаления остатков лимонной кислоты твердый остаток после экстракции (модифицированная шелуха) промывали горячей водой на стеклянном фильтре до нейтрального значения pH фильтрата и сушили при 60 °C.

Состав биомасла анализировали на хроматографе 7820 A с селективным масс-спектрометрическим детектором HP 5975 фирмы Agilent Technologies с использованием кварцевой колонки 30000×0,25 мм со стационарной фазой (95% диметил – 5% дифенилполисилоксан). Условия анализа: 3 мин изотермы при 50 °C, подъем температуры до 250 °C со скоростью 6 °C/мин, выдержка в течение 40 мин при температуре 250 °C. Идентификацию соединений осуществляли с использованием библиотеки масс-спектров NIST 11. Относительное содержание идентифицированных соединений вычисляли по площадям пиков без корректирующих коэффициентов чувствительности.

Инфракрасные (ИК) спектры регистрировали на ИК-спектрометре IRAffinity-1 (Shimadzu Corporation, Япония) в спектральной области 400–4000 см$^{-1}$. Образцы для спектральных исследований готовили в виде спрессованных таблеток, состоящих из смеси сухого измельченного исследуемого образца и порошка KBr в отношении 1–2 мг к 200 мг.

Общее содержание карбоксильных групп (ОКГ) и содержание свободных карбоксильных групп (СКГ) в образцах шелухи определяли методом кондуктометрического титрования [18]. Содержание этерифицированных карбоксильных групп (ЭКГ) рассчитывали по разности ОКГ и СКГ.

Образцы прессованной шелухи для механических испытаний были получены в виде дисков диаметром 50 мм и толщиной 3,0–3,5 мм методом горячего прессования с использованием гидравлического пресса. Навеску шелухи смешивали с пластификатором (глицерин, 10%) при комнатной температуре. Полученную смесь выдерживали в сушильном шкафу при температуре 105 °C в течение 3 ч, после чего загружали в предварительно нагретую пресс-форму. Режимы прессования: температура 220 °C, давление 20 МПа, продолжительность 3 мин. После сброса давления диск выдерживали в пресс-форме в течение 3 мин.

Оценку механических характеристик прессовок проводили с помощью универсальной испытательной машины AGS-X Shimadzu (Shimadzu Corporation, Япония) на трехточечный изгиб со скоростью нагружения 1 мм/мин. Толщину прессовок измеряли с помощью механического микрометра TOPEX 31c629 (TOPEX, Китай).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биомасса исходной шелухи характеризуется относительно высоким содержанием целлюлозы и белков, а также незначительным содержанием лигнина (табл. 1). На долю экстрактивных веществ приходится 8,1% масс. В результате обработки шелухи 4%-м раствором щелочи из ее биомассы было выделено 19,2% водорастворимых соединений. При этом удалось существенно снизить содержание белков и повысить содержание целлюлозы.

Исходный образец шелухи содержит карбоксильные группы как в свободной форме, так и в этерифицированной – в составе сложных эфиров (см. табл. 1). На долю СКГ приходится около 60% от общего содержания карбоксильных групп, которое было определено методом обратного кондуктометрического титрования после щелочного гидролиза сложных эфиров. После щелочной обработки содержание ОКГ снижается практически в 2 раза: прежде всего, вероятно, за счет удаления свободных карбоновых кислот, присутствующих в составе экстрактивных веществ [19]. Содержание сложных эфиров после щелочной обработки практически не изменилось.

Основными продуктами термообработки смеси шелухи и лимонной кислоты являются модифицированная шелуха и биомасло (табл. 2). Наряду с ними в условиях эксперимента выделяются газы и низкомолекулярные продукты превращения, которые не улавливали, поскольку термообработку проводили в открытой системе.

При температуре обработки 110 °C выход модифицированной шелухи составил около 60% от исходной массы

Таблица 1. Характеристика химического состава образцов шелухи сои

Table 1. Chemical composition of soybean husk samples

Шелуха	Компонентный состав, масс.%			Содержание карбоксильных групп, ммоль/г			СКГ/ОКГ
	Целлюлоза	Лигнин	Белки	СКГ	ОКГ	ЭКГ	
Исходная	43,7	3,1	9,4	0,080	0,137	0,057	0,58
После обработки щелочью	49,6	4,2	1,6	0,019	0,073	0,054	0,26

Таблица 2. Состав и выход продуктов термообработки смеси шелухи сои и лимонной кислоты

Table 2. Composition and yield of heat treatment products of soybean husk and citric acid mixture

Температура обработки, °C	Исходный реагент, г		Продукт, г	
	Шелуха	Лимонная кислота	Модифицированная шелуха	Биомасло
110	2,01	1,26	1,19	0,48
130	2,01	1,26	1,23	0,39
155	2,01	1,26	1,30	0,26
170	2,01	1,26	1,43	0,05

Примечание. Продолжительность термообработки – 60 мин.

образца. Более 40% биомассы шелухи превратилось в низкомолекулярные соединения биомасла и летучей фракции. Высокий выход низкомолекулярных продуктов, по-видимому, обусловлен кислотным гидролизом основных компонентов биомассы шелухи. В этих условиях получен максимальный выход биомасла, который с повышением температуры до 170 °С значительно снижается.

Методом хромато-масс-спектрометрии в составе биомасла идентифицированы продукты превращения полисахаридов шелухи и лимонной кислоты. Независимо от температуры обработки продукты превращения лимонной кислоты являются основными компонентами биомасла: на их долю приходится от 55 до 82%. В составе биомасла, полученного при 110 °С, присутствует продукт дегидратации лимонной кислоты (1) 3-карбоксибутендиовая кислота (2) и продукт ее гидрирования 3-карбоксибутандиовая кислота. При температурах выше 130 °С эти кислоты в биомасле не обнаружены. Идентифицированы продукты декарбоксилирования и дегидратации 3-карбоксибутендиовой кислоты: цитраконовый ангидрид (3), итаконовая кислота (4) и итаконовый ангидрид (5). На основе полученных данных предложена схема превращения лимонной кислоты в условиях процесса термической этерификации шелухи сои (рис. 1).

Продукты превращения полисахаридов шелухи представлены фурановыми соединениями, на долю которых в биомасле, полученном при 110 °С, приходится 1,8% отн. С повышением температуры содержание этих соединений проходит через максимум при 155 °С (8,1% отн.), а при 170 °С снижается до 2,0% отн., вероятно, в результате вторичных превращений и испарения. Высокий выход продуктов гидролиза при 155 °С, предположительно, вызван тем, что расплавленная в этих условиях лимонная кислота действует как концентрированный раствор кислоты, катализирующий гидролиз целлюлозы. Согласно источнику [20], образование фурановых соединений в условиях эксперимента происходит в результате кислотного гидролиза полисахаридов и последующей дегидратации полученных моносахаридов с образованием оксиметилфурфурола и фурфурола. Наряду с ними в биомаслах, полученных в условиях эксперимента, идентифицирован продукт окисления фурфурола пирослизевая кислота, а также продукт его димеризации ди-α-фурилэтандиол и последующего окисления ди-α-фурилэтандион.

В следовых количествах в биомаслах присутствуют ароматические соединения (бензойная кислота, гваяцилпропанон-2) и карбоновые кислоты C_{14}–C_{18}.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что в процессе термообработки наряду с кислотным гидролизом целлюлозы происходят реакции этерификации, в которых участвуют гидроксильные группы целлюлозы и карбоксильные группы кислоты. Вследствие этого выход модифицированной шелухи, в отличие от выхода биомасла, увеличивается с повышением температуры процесса благодаря связыванию молекул лимонной кислоты гидроксильными группами целлюлозы (см. табл. 2).

Протекание процесса этерификации в исследуемом интервале температур было подтверждено методом ИК-спектроскопии. На ИК-спектрах модифицированной шелухи присутствует интенсивная полоса поглощения при 1739 см$^{-1}$, характерная для валентных колебаний карбонильных групп сложных эфиров и карбоновых кислот (рис. 2). На ИК-спектре исходной шелухи она выражена слабо, в виде плеча. Существенное увеличение ее интенсивности наблюдается уже после термообработки при 110 °С в течение 60 мин. При повышении температуры термообработки интенсивность этой полосы увеличивается.

На полученных ИК-спектрах практически невозможно различить сигналы карбонильных групп карбоновых кислот и сложноэфирных связей, поскольку они перекрываются. В связи с этим отмеченные изменения характера ИК-спектра могут свидетельствовать не только об образовании сложных эфиров в результате этерификации, но и о накоплении в модифицированной шелухе свободных карбоксильных групп. Для уточнения данного факта, а также для изучения влияния температуры и продолжительности термообра-

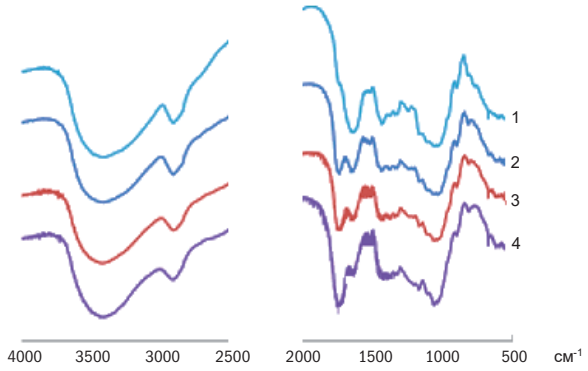


Рис. 2. Инфракрасные спектры исходной шелухи сои (1) и образцов модифицированной шелухи, полученных после обработки лимонной кислотой при температурах 110 °С (2), 155 °С (3) и 170 °С (4) (продолжительность обработки – 60 мин)

Fig. 2. Infrared spectra of initial soybean husks (1) and samples of modified husks treated with citric acid at temperatures 110 °С (2), 155 °С (3), and 170 °С (4) (the processing time is 60 minutes)

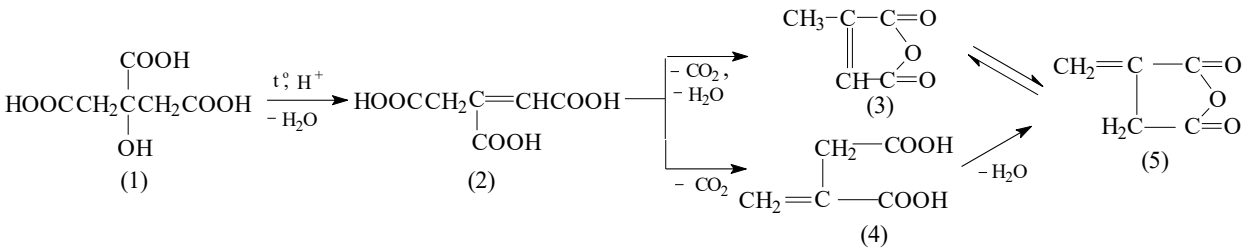


Рис. 1. Схема превращения лимонной кислоты в условиях процесса термической этерификации

Fig. 1. Scheme of transformation of citric acid under conditions of thermal esterification

ботки на эффективность процесса этерификации было определено содержание СКГ и ОКГ в образцах исходной и модифицированной шелухи.

Лимонная кислота является трикарбоновой кислотой, карбоксильные группы которой способны реагировать с гидроксильными группами целлюлозы. Это взаимодействие сопровождается как образованием поперечных сложноэфирных связей между цепочками целлюлозы, так и накоплением в биомассе шелухи свободных карбоксильных групп. Степень сшивки полимерных цепей целлюлозы может быть определена через соотношение СКГ/ОКГ. Чем ниже значение этого соотношения, тем выше степень сшивки. Для лимонной кислоты значения варьируются от 0 (полное сшивание) до 2/3 (отсутствие сшивания). В диапазоне значений от 0 до 1/3 в среднем имеется до одной свободной карбоксильной группы [12].

Динамика изменения содержания карбоксильных групп в свободной и этерифицированной формах свидетельствует о протекании процесса этерификации при температурах ниже температуры плавления лимонной кислоты (рис. 3). Так, при температуре 110 °С наблюдается десятикратное повышение содержания ОКГ до 0,8 ммоль/г. В их составе более половины карбоксильных групп входит в состав сложноэфирных связей. При температурах выше 155 °С рост содержания ОКГ происходит в основном за счет образования сложноэфирных связей. Содержание СКГ практически не изменяется. В этих условиях получена наибольшая степень сшивки цепочек целлюлозы, равная 0,18.

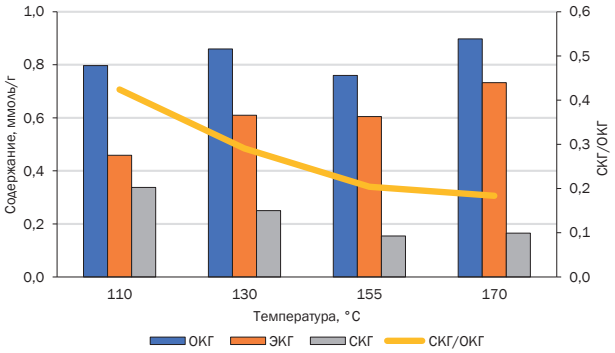


Рис. 3. Зависимость содержания карбоксильных групп и степени сшивки от температуры термообработки (продолжительность обработки – 60 мин)

Fig. 3. Dependence of the content of carboxyl groups and cross-linking degree on the temperature of heat treatment (the processing time is 60 minutes)

При 155 °С этерификация целлюлозы шелухи протекает с относительно высокой скоростью, так как степень сшивки, равная 0,34, получена уже через 30 мин (рис. 4). С увеличением продолжительности термообработки до 120 мин в составе модифицированной шелухи повышается содержание ЭКГ и снижается содержание свободных карбоксильных групп. При продолжительности термообработки 180 мин отмечено незначительное уменьшение содержания ЭКГ, но при этом получена наибольшая степень сшивки. Значение соотношения СКГ/ОКГ составило 0,1.

Для выявления влияния процесса этерификации на механические свойства прессованной шелухи было проведено сравнительное исследование двух образцов (табл. 3). Образец 1 был приготовлен горячим прессованием очищенной шелухи сои, образец 2 – модифицированной шелухи, полученной в результате обработки шелухи лимонной кислотой при 155 °С в течение 180 мин.

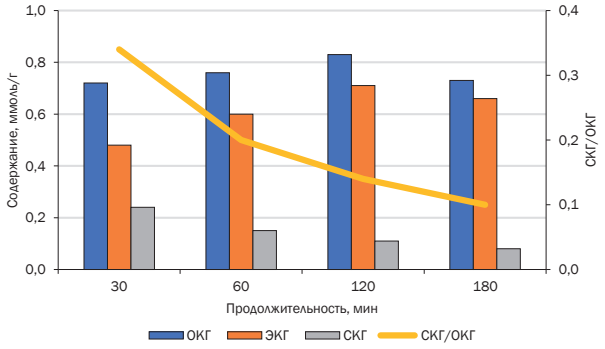


Рис. 4. Зависимость содержания карбоксильных групп и степени сшивки от продолжительности термообработки при 155 °С

Fig. 4. Dependence of the content of carboxyl groups and cross-linking degree on the duration of heat treatment at 155 °С

Прессовки подвергали испытанию на трехточечный изгиб. Были проанализированы три ключевых параметра: предел прочности при изгибе, модуль упругости и деформация изгиба (см. табл. 3).

Таблица 3. Влияние процесса этерификации лимонной кислотой на механические свойства прессованной шелухи

Table 3. Effect of the esterification process with citric acid on the mechanical properties of pressed husks

Образец	Максимальное напряжение, МПа	Модуль упругости при изгибе, ГПа	Деформация изгиба, %
1	10,38	1,58	2,08
2	12,65	2,37	1,73

Обработка шелухи лимонной кислотой привела к улучшению механических свойств прессовок. Образец 2 продемонстрировал увеличение прочности материала в 1,2 раза и модуля упругости в 1,5 раза и, как следствие, уменьшение деформации изгиба. Это свидетельствует о повышенной жесткости прессованной модифицированной шелухи, благодаря чему она способна выдерживать более высокие нагрузки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты убедительно подтверждают перспективность использования процесса этерификации лимонной кислотой для повышения прочности и жесткости прессованной соевой шелухи. Термообработка шелухи в присутствии лимонной кислоты в интервале температур 110–170 °С без использования растворителей и катализаторов сопровождается гидролизом и этерификацией полисахаридов. Протекание процесса этерификации подтверждено результатами исследования модифицированной шелухи методами ИК-спектроскопии и кондуктометрического титрования. Установлено, что степень сшивки полимерных цепочек целлюлозы увеличивается с повышением температуры и продолжительности термообработки.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Yao G., Hertel T.W., Taheripour F. Understanding China's soybean boom from historical validation // Agricultural and Applied Economics Association (AAEA) Conferences: 2017 Annual Meeting (Chicago, 30 July – 1 August 2017). Chicago, 2017. 27 p. DOI: 10.22004/ag.econ.258373.

2. Smith W.B., Coffey K.P., Tucker J.D., Hubbell D.S., Kegley E.B., Philipp D., et al. Using soybean hulls to meet dietary energy requirements of gestating cows having restricted access to poor-quality hay // The Professional Animal Scientist. 2017. Vol. 33, no. 1. P. 101–107. DOI: 10.15232/pas.2016-01553.

3. Bittencourt G.A., de Souza Vandenberghe L.P., Valladares-Diestra K., Herrmann L.W., de Mello A.F.M., Vásquez Z.S., et al. Soybean hulls as carbohydrate feedstock for medium to high-value biomolecule production in biorefineries: a review // Bioresource Technology. 2021. Vol. 339. P. 125594. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125594.

4. Barros P.J.R., Ascheri D.P.R., Santos M.L.S., Morais C.C., Ascheri J.L.R., Signini R., et al. Soybean hulls: optimization of the pulping and bleaching processes and carboxymethyl cellulose synthesis // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. Vol. 144. P. 208–218. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.074.

5. Yoo J., Alavi S., Vadlani P., Amanor-Boadu V. Thermo-mechanical extrusionpretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars // Bioresource Technology. 2011. Vol. 102. P. 7583–7590. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.04.092.

6. Ferrer A., Salas C., Rojas O.J. Physical, thermal, chemical and rheological characterization of cellulosic microfibrils and microparticles produced from soybean hulls // Industrial Crops and Products. 2016. Vol. 84. P. 337–343. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.02.014.

7. Bortolatto R., Bittencourt P.R.S., Yamashita F. Biodegradable starch / polyvinyl alcohol composites produced by thermoplastic injection containing cellulose extracted from soybean hulls (*Glycine max* L.) // Industrial Crops & Products. 2022. Vol. 176. P. 114383. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.114383.

8. Merci A., Marim R.G., Urbano A., Mali S. Films based on cassava starch reinforced with soybean hulls or microcrystalline cellulose from soybean hulls // Food Packaging and Shelf Life. 2019. Vol. 20. P. 100321. DOI: 10.1016/j.fpsl.2019.100321.

9. Gebresas G.A., Szabó T., Marossy K. A comparative study of carboxylic acids on the cross-linking potential of corn starch films // Journal of Molecular Structure. 2023. Vol. 1277. P. 134886. DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.134886.

10. Ray R., Das S.N., Das A. Mechanical, thermal, moisture absorption and biodegradation behaviour of date palm leaf reinforced PVA/starch hybrid composites // Materials Today: Proceedings. 2021. Vol. 41, pt. 2. P. 376–381. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.09.564.

11. Alavarse A.C., Frachini E.C.G., da Silva R.L.C.G., Lima V.H., Shavandi A., Petri D.F.S. Crosslinkers for polysaccharides and proteins: synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review // International Journal of Biological Macromolecules. 2022. Vol. 202. P. 558–596. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.029.

12. Reddy N., Yang Y. Citric acid cross-linking of starch films // Food Chemistry. 2010. Vol. 118, no. 3. P. 702–711. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.05.050.

13. Zoldners J., Kiseleva T. Modification of hemicelluloses with polycarboxylic acids // Holzforschung. 2013. Vol. 67, no. 5. P. 567–571. DOI: 10.1515/hf-2012-0183.

14. Li D., Henschen J., Ek M. Esterification and hydrolysis of cellulose using oxalic acid dihydrate in a solvent-free reaction suitable for preparation of surface-functionalised cellulose nanocrystals with high yield // Green Chemistry. 2017. Vol. 19, no. 23. P. 5564–5567. DOI: 10.1039/C7GC02489D.

15. Shao H., Sun H., Yang B., Zhang H., Hu Y. Facile and green preparation of hemicellulose-based film with elevated hydrophobicity *via* cross-linking with citric acid // RSC Advances. 2019. Vol. 9, no. 5. P. 2395–2401. DOI: 10.1039/C8RA09937E.

16. Cui X., Honda T., Asoh T.-A., Uyama H. Cellulose modified by citric acid reinforced polypropylene resin as fillers // Carbohydrate Polymers. 2020. Vol. 230. P. 115662. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115662.

17. Feldman D. Cellulose nanocomposites // Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry. 2015. Vol. 52, no. 4. P. 322–329. DOI: 10.1080/10601325.2015.1007279.

18. Otal E.H., Kim M.L., Hinestroza J.P., Kimura M. A solid-state pathway towards the tunable carboxylation of cellulosic fabrics: controlling the surface's acidity // Membranes. 2021. Vol. 11, no. 7. P. 514. DOI: 10.3390/membranes11070514.

19. Ахматгалиева К.И., Амракулова А.А., Тигунцева Н.П., Евстафьев С.Н. Экстрактивные вещества соевой шелухи // Актуальные проблемы химии, биотехнологии и сферы услуг: материалы VIII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. уч. (г. Иркутск, 25–26 апреля 2024 г.). Иркутск: Изд-во ИРНИТУ, 2024. С. 58–62. EDN: OXNRNG.

20. Romeo I., Olivito F., Tursi A., Algieri V., Beneduci A., Chidichimo G., et al. Totally green cellulose conversion into bio-oil and cellulose citrate using molten citric acid in an open system: synthesis, characterization and computational investigation of reaction mechanisms // RSC Advances. 2020. Vol. 10, no. 57. P. 34738–34751. DOI: 10.1039/d0ra06542k.

REFERENCES

1. Yao G., Hertel T.W., Taheripour F. Understanding China's soybean boom from historical validation. In: *Agricultural and Applied Economics Association (AAEA) Conferences: 2017 Annual Meeting.* 30 July – 1 August 2017, Chicago. Chicago; 2017, 27 p. DOI: 10.22004/ag.econ.258373.

2. Smith W.B., Coffey K.P., Tucker J.D., Hubbell D.S., Kegley E.B., Philipp D., et al. Using soybean hulls to meet dietary energy requirements of gestating cows having restricted access to poor-quality hay. *The Professional Animal Scientist*. 2017;33(1):101-107. DOI: 10.15232/pas.2016-01553.

3. Bittencourt G.A., de Souza Vandenberghe L.P., Valladares-Diestra K., Herrmann L.W., de Mello A.F.M., Vásquez Z.S., et al. Soybean hulls as carbohydrate feedstock for medium to high-value biomolecule production in biorefineries: a review. *Bioresource Technology*. 2021;339:125594. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125594.

4. Barros P.J.R., Ascheri D.P.R., Santos M.L.S., Morais C.C., Ascheri J.L.R., Signini R., et al. Soybean hulls: optimization of the pulping and bleaching processes and carboxymethyl cellulose synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;144:208-218. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.074.

5. Yoo J., Alavi S., Vadlani P., Amanor-Boadu V. Thermo-mechanical extrusionpretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars. *Bioresource Technology*. 2011;102:7583-7590. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.04.092.

6. Ferrer A., Salas C., Rojas O.J. Physical, thermal, chemical and rheological characterization of cellulosic microfibrils and microparticles produced from soybean hulls. *Industrial Crops and Products*. 2016;84:337-343. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.02.014.

7. Bortolatto R., Bittencourt P.R.S., Yamashita F. Biodegradable starch / polyvinyl alcohol composites produced by thermoplastic injection containing cellulose extracted from soybean hulls (*Glycine max* L.). *Industrial Crops & Products*. 2022;176:114383. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.114383.

8. Merci A., Marim R.G., Urbano A., Mali S. Films based on cassava starch reinforced with soybean hulls or microcrystalline cellulose from soybean hulls. *Food Packaging and Shelf Life*. 2019;20:100321. DOI: 10.1016/j.fpsl.2019.100321.

9. Gebresas G.A., Szabó T., Marossy K. A comparative study of carboxylic acids on the cross-linking potential of corn starch films. *Journal of Molecular Structure*. 2023;1277:134886. DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.134886.

10. Ray R., Das S.N., Das A. Mechanical, thermal, moisture absorption and biodegradation behaviour of date palm leaf reinforced PVA/starch hybrid composites. *Materials Today: Proceedings*. 2021;41:376-381. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.09.564.

11. Alavarse A.C., Frachini E.C.G., da Silva R.L.C.G., Lima V.H., Shavandi A., Petri D.F.S. Crosslinkers for polysaccharides and proteins: synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;202:558-596. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.029.

12. Reddy N., Yang Y. Citric acid cross-linking of starch films. *Food Chemistry*. 2010;118(3):702-711. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.05.050.

13. Zoldners J., Kiseleva T. Modification of hemicelluloses with polycarboxylic acids. *Holzforschung*. 2013; 67(5):567-571. DOI: 10.1515/hf-2012-0183.

14. Li D., Henschen J., Ek M. Esterification and hydrolysis of cellulose using oxalic acid dihydrate in a solvent-free reaction suitable for preparation of surface-functionalised cellulose nanocrystals with high yield. *Green Chemistry*. 2017;19(23):5564-5567. DOI: 10.1039/C7GC02489D.

15. Shao H., Sun H., Yang B., Zhang H., Hu Y. Facile and green preparation of hemicellulose-based film with elevated hydrophobicity *via* cross-linking with citric acid. *RSC Advances*. 2019;9(5):2395-2401. DOI: 10.1039/C8RA09937E.

16. Cui X., Honda T., Asoh T.-A., Uyama H. Cellulose modified by citric acid reinforced polypropylene resin as fillers. *Carbohydrate Polymers*. 2020;230:115662. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115662.

17. Feldman D. Cellulose nanocomposites. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*. 2015;52(4):322-329. DOI: 10.1080/10601325.2015.1007279.

18. Otal E.H., Kim M.L., Hinestroza J.P., Kimura M. A solid-state pathway towards the tunable carboxylation of cellulosic fabrics: controlling the surface's acidity. *Membranes*. 2021;11(7):514. DOI: 10.3390/membranes11070514.

19. Akhmatgalieva K.I., Amrakulova A.A., Tiguntceva N.P., Evstaf'ev S.N. Extractive substances of soy husk. In: *Aktual'nye problemy khimii, biotekhnologii i sfery uslug: materialy VIII Vseros. nauch.-prakt. konf. s mezhdunar. uch. = Actual problems of chemistry, biotechnology and the service sector: Proc. of the 8th All-Russian Sci. and Pract. Conf. with Int. part.* 25–26 April 2024, Irkutsk. Irkutsk: Irkutsk National Research Technical University; 2024, p. 58-62. (In Russian). EDN: OXNRNG.

20. Romeo I., Olivito F., Tursi A., Algieri V., Beneduci A., Chidichimo G., et al. Totally green cellulose conversion into bio-oil and cellulose citrate using molten citric acid in an open system: synthesis, characterization and computational investigation of reaction mechanisms. *RSC Advances*. 2020;10(57):34738-34751. DOI: 10.1039/d0ra06542k.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Евстафьев Сергей Николаевич,
д.х.н., профессор, заведующий кафедрой химии и биотехнологии им. В.В. Тутуриной,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
esn@istu.edu
https://orcid.org/0000-0002-3681-9478

Фомина Елена Сергеевна,
к.х.н., доцент, доцент,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ lenafomina1982@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-0307-3382

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Sergei N. Evstaf'ev,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Head of the Department of Chemistry and Biotechnology named after V.V. Tuturina,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
esn@istu.edu
https://orcid.org/0000-0002-3681-9478

Elena S. Fomina,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ lenafomina1982@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-0307-3382

Тигунцева Надежда Павловна,
к.х.н., доцент, доцент,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
tignadezhda@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0001-5348-5345

Nadezhda P. Tiguntceva,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
tignadezhda@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0001-5348-5345

Вклад авторов

С.Н. Евстафьев – научное руководство, написание черновика рукописи, редактирование рукописи.
Е.С. Фомина – проведение исследования, написание черновика рукописи.
Н.П. Тигунцева – проведение исследования.

Contribution of the authors

Sergei N. Evstaf'ev – supervision, writing – original draft, editing.
Elena S. Fomina – investigation, writing – original draft.
Nadezhda P. Tiguntceva – investigation.

Конфликт интересов

С.Н. Евстафьев является членом редакционной коллегии журнала «Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология» с 2011 года, но не имеет отношения к решению опубликовать эту статью. Статья прошла принятую в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах авторы не заявляли.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

Sergei N. Evstaf'ev has been a member of the Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology Journal Editorial Board since 2011, but he was not involved in making decision about accepting the present article for publication. The article was subjected the Journal's review procedure. The authors did not report any other conflicts of interest.

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

Информация о статье

Поступила в редакцию 08.04.2025.
Одобрена после рецензирования 15.04.2025.
Принята к публикации 31.05.2025.

Information about the article

The article was submitted 08.04.2025.
Approved after reviewing 15.04.2025.
Accepted for publication 31.05.2025.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 663.32:634.11
EDN: AUPZKI
DOI: 10.21285/achb.978

Исследование динамики осветления свежего яблочного сусла различных сортов яблони юга России

Н.М. Агеева, А.А. Ширшова✉, А.А. Храпов

Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Российская Федерация

Аннотация. *Исследование динамики осветления яблочного сусла и уплотнения сусловых осадков дает представление изготовителям сидров о возможности применения технологических вспомогательных средств, их дозировках и схемах обработки сусла для его осветления. В настоящей работе изучена динамика осветления свежего яблочного сусла из сортов Марго, Джин, Орфей, Кармен, Экзотика, Либерти, Персиковое, Амулет, Золотое летнее, Кетни. С этой целью осветление сусла проводили спонтанно (отстаиванием) и с применением ферментных препаратов SQzyme PCL и Фруктоцим Р. Мутность сусла определяли с помощью турбидиметра-мутномера LabScat 2. Установлено, что спонтанное осветление свежего яблочного сусла протекало медленно. Внесение ферментных препаратов заметно активизировало процесс осветления. Применение SQzyme PCL уже через 8–16 ч приводило к снижению мутности яблочного сусла из сортов Марго, Джин, Орфей, Экзотика, Либерти на 5–8% в сравнении со спонтанным осветлением сусла из аналогичных сортов. Эффективность препарата Фруктоцим Р была несколько ниже. Показано, что динамика уплотнения сусловых осадков существенно зависит от сортовых особенностей яблочного сусла и продолжительности процесса осветления. Рассчитана величина скорости уплотнения осадков. Наибольшее ее значение отмечено в сусле из сортов Марго, Экзотика, Орфей, наименьшее – в сусле из сорта Персиковое. Внесение SQzyme PCL привело к увеличению скорости уплотнения осадка в 1,5–4,0 раза. Наибольшее увеличение скорости уплотнения осадка отмечено в вариантах сусла из сортов Персиковое и Кармен.*

Ключевые слова: *плоды яблони, свежее яблочное сусло, осветление, мутность, ферментные препараты, уплотнение осадков*

Благодарности. *В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования технологичным оборудованием Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия (г. Краснодар, Россия).*

Финансирование. *Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № МФИ-20.1/100.*

Для цитирования: Агеева Н.М., Ширшова А.А., Храпов А.А. Исследование динамики осветления свежего яблочного сусла различных сортов яблони юга России // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 196–206. DOI: 10.21285/achb.978. EDN: AUPZKI.

© Агеева Н.М., Ширшова А.А., Храпов А.А., 2025

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Clarification dynamics of fresh apple must obtained from different apple cultivars grown in the south of Russia

Natalia M. Ageyeva, Anastasia A. Shirshova✉, Anton A. Khrapov

North Caucasian Federal Scientific Centre of Horticulture, Viticulture, Wine-making, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. *Studies on the clarification and compact settling dynamics of apple must provide cider makers with insight into the possibility of using processing aids to achieve must clarification, as well as a better understanding of their usage levels and schemes. The present article analyzes the clarification dynamics of fresh apple must produced from the following cultivars: Margo, Dzhin, Orfey, Karmen, Ekzotika, Liberty, Persikovoe, Amulet, Zolotoe Letnee, and Ketni. In the study, the must clarification was carried out spontaneously (natural settling) and with the use of enzyme preparations, SQzyme PCL and Fructozym P. Must turbidity was determined using a LabScat 2 turbidity meter. The spontaneous clarification of fresh apple must was found to proceed slowly. The use of enzyme preparations significantly enhanced the clarification process. Within 8–16 h of adding SQzyme PCL, a 5–8% decrease was observed in the turbidity of apple must obtained from the cultivars Margo, Dzhin, Orfey, Ekzotika, and Liberty as compared to the spontaneous clarification of must obtained from the same cultivars. The efficacy of Fructozym P. was slightly lower. The compact settling dynamics of must are shown to depend significantly on the varietal characteristics of apple must and clarification duration. The compact settling velocity was calculated. The highest rate was noted in the must obtained from the cultivars Margo, Ekzotika, and Orfey, while the lowest rate was noted in the must produced from the Persikovoe cultivar. The use of SQzyme PCL increased the compact settling velocity by 1.5–4.0 times. The largest increase in the compact settling velocity was observed in the must obtained from Persikovoe and Karmen cultivars.*

Keywords: *apple fruit, fresh apple must, clarification, turbidity, enzyme preparations, compact settling*

Acknowledgment. *The study was carried out using the equipment of the Centers for Collective Use of Technological Equipment of the North Caucasus Federal Scientific Center for Horticulture, Viticulture, and Winemaking (Krasnodar).*

Funding. *The Kuban Science Foundation supported the research in the framework of the scientific project no. MFI-20.1/100.*

For citation: Ageyeva N.M., Shirshova A.A., Khrapov A.A. Clarification dynamics of fresh apple must obtained from different apple cultivars grown in the south of Russia. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2):196-206. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.978. EDN: AUPZKI.

ВВЕДЕНИЕ

В виноделии для осветления и стабилизации свежего виноградного сусла и виноматериалов зачастую используют различные технологические вспомогательные средства, ферментные препараты, которых на российском рынке огромное количество. Яблочное сусло и сидр отличаются по химическому составу от виноградного сусла и вина. Вопросы стабилизации и осветления свежего и сброженного яблочного сусла малоизучены. Многие производители сидра во всем мире выпускают свою продукцию мутной, что допускается действующей в Российской Федерации нормативной документацией. Тем не менее для потребителя при оценке органолептических показателей сидров показатель «внешний вид» не менее важен, чем, например, «аромат» и «вкус» – в большинстве случаев предпочтение отдается напиткам прозрачным, без осадка и посторонних включений. Во Франции и Англии некоторые производители для того, чтобы осветлить яблочное сусло перед брожением, применяют технологический прием – кивинг, сущность которого заключается в удалении пектиновых веществ из яблочного сусла до начала брожения [1]. В то же время у данного технологического приема есть недостатки: вместе с пектиновыми веществами удаляются азотистые вещества, в том числе аминокислоты, микроэлементы и другие компоненты, тем самым сусло существенно «обедняется», из-за недостатка питательных веществ часть дрожжей погибает, а в готовом напитке остаются несброженные сахара.

Свежее яблочное сусло представляет собой сложную агрегативно неустойчивую коллоидно-химическую систему, состоящую из многочисленных частиц различной химической природы различных размеров и насыщенную полисахаридами [2]. Наличие большого количества последних, в том числе пектиновых веществ, приводит к медленному и плохому

самоосветлению свежего яблочного сусла [3]. Кроме того, присутствие пектиновых соединений, выполняющих роль «защитных коллоидов», препятствует образованию крупных коллоидных частиц, их агрегированию и седиментации. Это приводит к тому, что даже применение суспензий глинистых минералов (бентонитов) [4] или синтетических оклеивающих технологических вспомогательных средств не обеспечивает качественного осветления яблочного сусла, в связи с чем актуальным, несомненно, становится применение ферментных препаратов, особенно комплексного действия, в состав которых входят пектиназы. Эффективность использования комплексных ферментных препаратов при обработке яблочного сусла определяется их воздействием не столько на отдельные компоненты высокомолекулярных веществ, сколько на комплексы биополимеров, в том числе фенольно-полисахаридные, играющие большую роль в сложении структуры агрегативно неустойчивой коллоидно-химической системы яблочного сусла [5–7]. Комплексные ферментные препараты отличаются разнообразием групп ферментов, гидролизующих субстраты углеводной и белковой природы. Отличие между препаратами заключается в разных уровнях каталитической активности одного и того же фермента в зависимости от химического состава обрабатываемой среды и внешних условий. Гидролиз биополимеров, протекающий под действием комплексных ферментных препаратов или композиций, позволяет не только существенно снизить расход оклеивающих веществ в период обработки свежего яблочного сусла и сброженного яблочного сусла, но и повысить его коллоидную стабильность. Преимущества ферментативной обработки в плане пролонгирования устойчивости яблочного сока и сидров к помутнениям различной природы бесспорны [8–10].

В связи с этим целью проведенного исследования являлось изучение динамики осветления свежего яблочного сусла из различных сортов яблони юга России.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследований использовано свежее яблочное сусло из плодов яблони (далее – яблок) сортов отечественной и зарубежной селекции, в том числе сортов и форм селекции Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия (ФГБНУ СКФНЦСВВ) (г. Краснодар, Россия), различных сроков созревания (Марго, Джин, Орфей, Кармен, Экзотика, Либерти, Персиковое, Амулет, Золотое летнее, Кетни), произрастающих в Центре коллективного пользования «Исследовательско-селекционная коллекция генетических ресурсов садовых культур», расположенном в АО ОПХ «Центральное» (г. Краснодар) [11]. Отбор плодов яблони, типичных по форме, окраске и степени зрелости, с 3–5 деревьев каждого сорта проводили согласно общепринятой методике сортоизучения [12] в оптимальной зрелости с разных сторон кроны дерева по отношению к сторонам света.

Свежее яблочное сусло получали следующим образом: плоды яблони мыли, затем измельчали с помощью дробилки (мощность двигателя – 1,1 кВт, производительность – 500 кг/ч, размер частиц мезги – 0,4×0,4 см) каждый сорт по-отдельности, затем прессовали, отделяя свежее яблочное сусло от мезги с применением гидравлического пресса с мембраной EPDM 4 мм, давлением 250 кг/см^2 (производитель оборудования – ООО «Ректифай», г. Санкт-Петербург, Россия) в лабораторно-производственном подразделении «Микровиноделие» ФГБНУ СКФНЦСВВ. Для исследования динамики осветления в мезгу вносили ферментные препараты пектопротеолитического действия: SQzyme PCL (Suntaq, Китай) и Фруктоцим Р (Erbsloeh Geisenheim AG, Германия) в дозировке 1,5 см^3/дал сусла. Ферментный препарат SQzyme PCL представлял концентрированную жидкую пектиназу, состоящую из полиметилгалактуронатлиазы, полигалактуроназы, полигалактуронатлиазы и пектинэстеразы, рабочий диапазон температур – 25–65 °С). Ферментный препарат Фруктоцим Р – высококонцентрированную жидкую пектиназу, рабочий диапазон температуры – 45–55 °С). Выход сусла составил от 43,8 до 68,8% в зависимости от сорта яблони и ферментного препарата. Мутность сусла определяли с помощью турбидиметра-мутномера LabScat 2 (Sigrist, Швейцария) и измеряли в процентах относительно эталона, величина мутности которого составляла 100%. Наблюдения за изменением мутности проводили в течение 32 ч с шагом в 4 ч, для чего использовали осветлившуюся надосадочную часть свежего яблочного сусла. Так как из свежего яблочного сусла в дальнейшем планировалось изготавливать сидр, осветление сусла проводили отстаиванием при низких температурах (4–6 °С) согласно общепринятым основным правилам виноделия, наблюдая за динамикой изменения мутности.

Исследования проводили в НЦ «Виноделие» ФГБНУ СКФНЦСВВ. Измерение величины мутности опытных образцов свежего яблочного сусла, изучение уплотнения осадков и средней скорости уплотнения осадков проводили в трехкратной повторности с оценкой приемлемости результатов. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли методом дисперсионного анализа ANOVA (тест Тьюки) с использование программы Microsoft Excel 2021.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования (табл. 1) показали, что все образцы свежего яблочного сусла представляли собой пюреобразную мутную непрозрачную жидкость. Видимые признаки начала осветления наблюдали через 8–16 ч только в некоторых образцах сусла – Марго, Экзотика, Орфей. Сусло из сортов яблок Персиковое, Кетни, Амулет, Золотое летнее, Кармен оставалось мутным в течение суток наблюдения.

Статистическая обработка полученных экспериментальных данных методом дисперсионного анализа ANOVA (тест Тьюки) показала, что разность средних значений мутности между отдельными сортами сусла имела высокий уровень статистической значимости ($p < 0{,}01$), разность средних значений мутности в зависимости от ферментного препарата имела статистически достоверные различия ($P < 0{,}05$).

По качеству спонтанного осветления в зависимости от сорта яблок сусло можно разделить на следующие группы:

– Марго, Джин, Орфей, Экзотика, Либерти, в которых через 8 ч было заметно активное образование агрегатов, сопровождающееся признаками осветления;

Таблица 1. Изменение величины мутности свежего яблочного сусла

Table 1. Change in the turbidity value of fresh apple must

Сорт яблок	Мутность сусла, %					
	исходная	через 4 ч	через 8 ч	через 16 ч	через 24 ч	через 32 ч
Спонтанное осветление без внесения ферментных препаратов						
Марго	88,8	88,2	82,6	78,4	76,8	75,7
Джин	92,6	92,4	92,0	88,7	87,5	87,0
Орфей	91,8	90,5	88,7	87,4	86,7	85,4
Кармен	96,4	96,4	96,0	95,7	94,5	93,7
Экзотика	90,6	89,6	87,6	85,8	83,0	80,6
Либерти	91,8	91,8	90,4	88,7	87,3	85,7
Персиковое	Пюре	Пюре	94,8	93,0	91,7	91,0
Амулет	Пюре	Пюре	96,2	94,7	91,8	90,4
Золотое летнее	Пюре	Пюре	95,7	94,4	92,7	91,6
Кетни	Пюре	Пюре	Пюре	95,7	94,5	93,5
Осветление в присутствии ферментного препарата SQzyme PCL						
Марго	88,8	85,4	80,3	73,6	70,5	64,6
Джин	92,6	90,2	87,4	81,2	74,3	65,7
Орфей	91,8	89,6	86,4	80,8	76,7	70,3
Кармен	96,4	94,8	90,3	87,6	83,4	80,0
Экзотика	90,6	86,5	84,3	80,6	74,5	68,2
Либерти	91,8	88,6	85,4	80,5	74,7	70,4
Персиковое	Пюре	93,2	90,7	88,3	86,8	83,7
Амулет	Пюре	94,7	92,3	90,8	85,4	83,6
Золотое летнее	Пюре	Пюре	94,7	93,2	89,5	87,8
Кетни	Пюре	Пюре	Пюре	93,8	90,2	88,7
Осветление в присутствии ферментного препарата Фруктоцим Р						
Марго	88,8	87,2	84,6	81,5	78,3	76,4
Джин	92,6	92,4	90,4	87,8	85,3	81,4
Орфей	91,8	89,8	87,6	85,8	82,6	79,3
Кармен	96,4	94,4	90,3	87,6	85,4	84,0
Экзотика	90,6	86,5	93,3	88,4	85,7	84,4
Либерти	91,8	88,4	87,0	84,6	82,3	80,7
Персиковое	Пюре	93,9	91,6	90,3	87,2	85,8
Амулет	Пюре	95,8	94,6	92,3	90,8	88,3
Золотое летнее	Пюре	Пюре	96,2	93,8	90,6	88,8
Кетни	Пюре	Пюре	Пюре	95,0	93,5	90,2

– Кармен, Персиковое, Амулет, Золотое летнее, Кетни, в которых в течение 32 ч наблюдения сохранялось высокое значение мутности, а также отмечено расслоение жидкости на очень мутную и пюреобразную части (рис. 1).

Наиболее существенное снижение величины мутности было выявлено в первые 8 ч, в течение которых протекало взаимодействие между отдельными компонентами сусла с образованием конгломератов и агрегатов: в первой группе были заметны крупные частицы, медленно седиментирующие в процессе осветления, при этом сусло из яблок второй группы сохраняло пюреобразную консистенцию [13, 14].

Внесение в мезгу ферментного препарата SQzyme PCL (рис. 2) заметно активировало процесс осветления большинства образцов яблочного сусла. Наибольшее снижение величины мутности отмечено в образцах сусла из сортов Марго, Джин, Орфей, Экзотика, Либерти уже в течение первых часов наблюдения. Даже в труднообрабатываемых вариантах – Кармен, Кетни, Персиковое, Амулет, Золотое летнее – наблюдались процессы седиментации коллоидных частиц, что привело к снижению мутности и образованию осветленной части сусла.

Сравнительный анализ динамики осветления сусла с применением ферментных препаратов SQzyme PCL

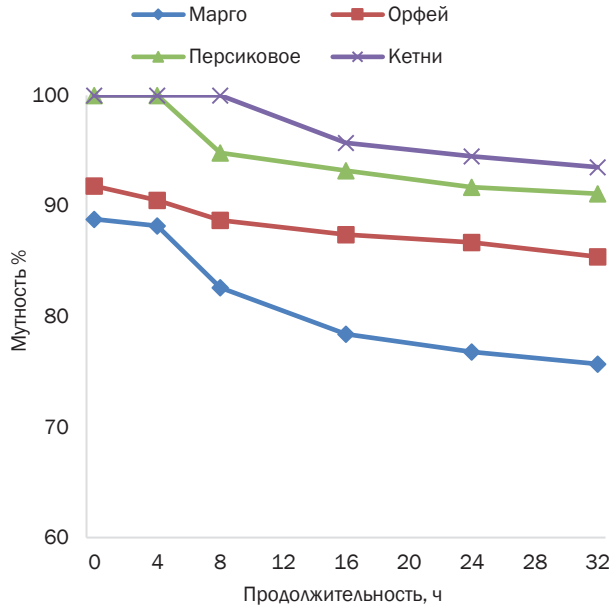


Рис. 1. Динамика спонтанного осветления сусла без внесения ферментных препаратов

Fig. 1. Dynamics of spontaneous must clarification without the addition of enzyme preparations

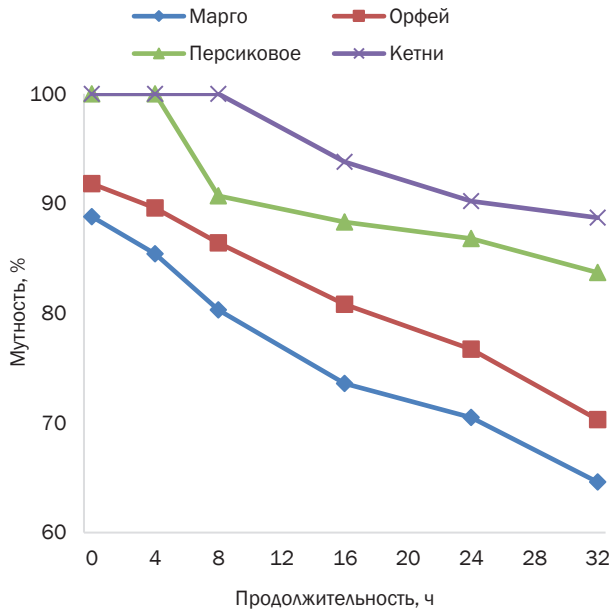


Рис. 2. Динамика осветления сусла с применением ферментного препарата SQzyme PCL

Fig. 2. Dynamics of must clarification using SQzyme PCL enzyme preparation

(см. рис. 2) и Фруктоцим Р (рис. 3) показал бóльшую эффективность ферментного препарата SQzyme PCL в сравнении с Фруктоцимом Р. Возможно, это связано с наличием в составе SQzyme PCL бóльшего количества пектиназ – полигалактуроназы, пектинлиазы, пектинэстеразы, пектинметилэстеразы, проявляющих высокую гидролитическую способность относительно полисахаридов, в том числе пектиновых веществ.

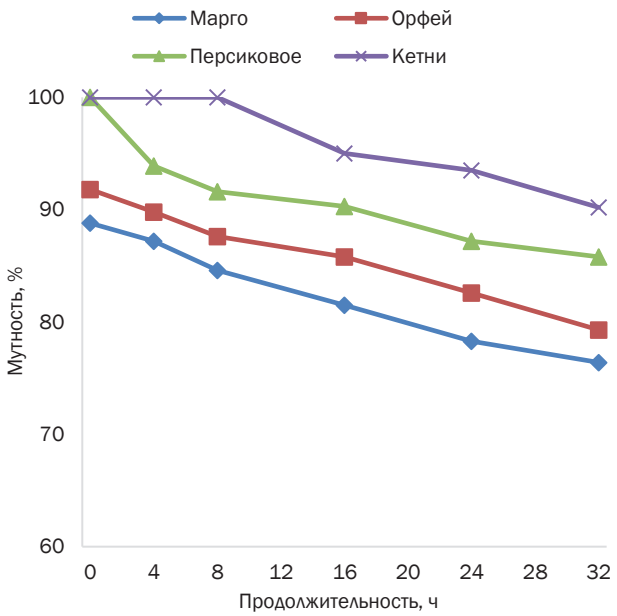


Рис. 3. Динамика осветления сусла с применением ферментного препарата Фруктоцим Р

Fig. 3. Dynamics of must clarification using Fructozyme R enzyme preparation

Применение ферментного препарата SQzyme PCL уже в течение 8–16 ч приводило к снижению мутности в свежем яблочном сусле из сортов Марго, Джин, Орфей, Экзотика, Либерти на 5–8% в сравнении со спонтанным осветлением. Даже в трудноосветляемых вариантах сусла из сортов яблок Персиковое, Кетни, Кармен отмечалось снижение величины мутности. Аналогичная тенденция наблюдалась при обработке сусла ферментным препаратом Фруктоцим Р, однако величина мутности была выше, а осветление протекало медленнее в сравнении результатами применения препарата SQzyme PCL.

К числу важнейших характеристик процесса осветления относится динамика формирования осадков и спонтанного уплотнения частиц, зависящая от их плотности и пористости, обусловленной количеством осаждаемых высокомолекулярных компонентов, их способностью образовывать прочные легко седиментирующие агрегаты [14, 15]. При этом осадки следует рассматривать как дисперсные системы, в которых дисперсной фазой являются твердые частицы, а дисперсной средой — жидкость, то есть осветленное сусло [16]. В результате такого уплотнения удаляется бóльшая часть жидкости, то есть сусла, энергия связи которого со структурой твердой фазы осадка снижается. Благодаря уплотнению осадков становится возможным увеличение выхода осветленного сусла для производства сидров. Уплотнение осадков является важной частью общей проблемы осветления яблочного сусла и соков, при этом значительно уменьшается их объем, пористость, но увеличивается выход осветленной фракции [17, 18].

Для проведения исследования осадки, образовавшиеся после спонтанного осветления сусла без использования ферментных препаратов и с их применением, отделяли от осветленной фракции и

оставляли для наблюдения за темпами осветления в цилиндрах с делениями (техника гравитационного уплотнения).

Для облегчения расчетов при исследовании использовали одинаковые объемы осадков (100 см^3). В табл. 2 приведена динамика уплотнений осадков и данные расчета средней скорости уплотнения осадка за весь период наблюдения при коэффициенте корреляции 0,93–0,95 [19].

Статистическая обработка полученных экспериментальных данных показала, что разность средних значений объема осадка и средней скорости уплотнения осадков между отдельными сортами сусла имела высокий уровень статистической значимости ($p < 0,01$), разность средних значений объема осадка и средней скорости уплотнения осадков в зависимости от внесенного ферментного препарата имела статистически достоверные различия ($P < 0,05$).

Таблица 2. Динамика уплотнения осадка

Table 2. Dynamics of sediment compaction

Сорт яблок	Объем осадка, см^3						Средняя скорость уплотнения осадка, см^3/ч
	исходный	через 1 сут.	через 2 сут.	через 3 сут.	через 4 сут.	через 5 сут.	
Спонтанное осветление без внесения ферментных препаратов							
Марго	100,0	95,8	92,4	87,4	80,8	76,2	0,25
Джин	100,0	98,6	96,5	93,4	90,7	86,4	0,14
Орфей	100,0	97,2	95,3	90,4	83,7	81,6	0,19
Кармен	100,0	98,7	97,0	95,0	93,2	91,7	0,09
Экзотика	100,0	94,8	91,0	87,5	82,6	80,0	0,21
Либерти	100,0	96,8	94,7	92,8	89,6	85,4	0,15
Персиковое	100,0	100,0	100,0	98,2	97,5	95,0	0,04
Амулет	100,0	100,0	97,6	95,0	93,2	91,4	0,09
Золотое летнее	100,0	100,0	98,2	96,4	93,5	91,8	0,09
Кетни	100,0	100,0	100,0	98,5	96,0	93,0	0,08
Осветление в присутствии ферментного препарата SQzyme PCL							
Марго	100,0	93,4	88,6	80,4	74,6	68,3	0,33
Джин	100,0	97,4	93,5	86,6	80,8	70,4	0,32
Орфей	100,0	93,2	90,4	87,0	80,5	74,0	0,27
Кармен	100,0	97,8	95,2	86,4	80,5	75,0	0,26
Экзотика	100,0	94,0	86,5	78,5	73,4	69,0	0,33
Либерти	100,0	94,6	90,8	87,0	81,4	74,2	0,27
Персиковое	100,0	100,0	93,6	88,4	83,2	77,6	0,16
Амулет	100,0	100,0	95,2	91,0	85,4	81,7	0,18
Золотое летнее	100,0	98,3	92,6	89,7	85,0	81,3	0,19
Кетни	100,0	100,0	100,0	94,6	89,5	83,2	0,17
Осветление в присутствии ферментного препарата Фруктоцим Р							
Марго	100,0	94,8	90,5	85,4	77,6	70,2	0,30
Джин	100,0	94,0	90,5	86,0	83,4	75,6	0,17
Орфей	100,0	94,6	92,8	89,3	84,0	76,0	0,17
Кармен	100,0	97,8	96,0	90,2	86,2	80,3	0,14
Экзотика	100,0	95,4	90,2	81,7	75,8	73,2	0,18
Либерти	100,0	96,5	92,4	89,0	83,6	78,0	0,16
Персиковое	100,0	100,0	98,5	93,5	89,3	84,8	0,13
Амулет	100,0	100,0	98,7	95,0	91,4	84,7	0,13
Золотое летнее	100,0	98,3	95,6	91,7	87,6	85,0	0,13
Кетни	100,0	100,0	100,0	100,0	95,5	90,5	0,12

В результате исследований установлена зависимость между качеством осветления свежего яблочного сусла и динамикой уплотнения осадков. Наибольшая скорость спонтанного уплотнения осадков отмечалась в вариантах сусла из яблок сортов Марго, Экзотика, Орфей, наименьшая – в сусле из сорта Персиковое. Внесение ферментного препарата SQzyme PCL привело к увеличению скорости уплотнения осадка в 1,5–4,0 раза. Наибольшее увеличение скорости отмечено в вариантах сусла из сортов Персиковое (в 4,0 раза) и Кармен (в 2,9 раза), что свидетельствует о трансформации сложных комплексов, включающих полисахариды, в том числе пектиновые вещества [20–25].

На рис. 4–6 наглядно прослеживаются основные этапы уплотнения осадков, различающиеся в зависимости от сорта яблок. Для сортов Персиковое и Кетни видимые признаки уплотнения осадков наблюдали через 3 сут. Внесение ферментных препаратов, особенно SQzyme PCL, способствовало ускорению процесса уплотнения: видимые признаки группирования осадка отмечали уже на 2-е сут. наблюдения.

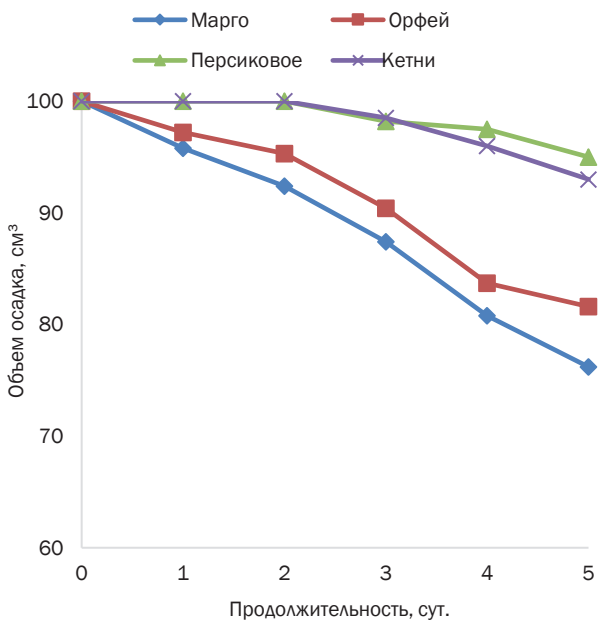


Рис. 4. Динамика уплотнения осадка при спонтанном осветлении сусла без внесения ферментных препаратов

Fig. 4. Dynamics of sediment compaction during spontaneous must clarification without the addition of enzyme preparations

На рис. 7 представлено изменение скорости уплотнения осадков в зависимости от сорта яблок и применения ферментного препарата. Из данных рисунка следует, что осадки спонтанно осветлившегося сусла уплотняются медленнее независимо от сорта яблок.

Внесение ферментных препаратов позволило увеличить скорость уплотнения осадков, особенно в трудно-обрабатываемых образцах сусла – Персиковое и Кетни (в 1,5–2,0 раза). Следовательно, внесение ферментных препаратов обеспечивает увеличение выхода сусла не только при переработке яблок, но и при группировке сусловых осадков.

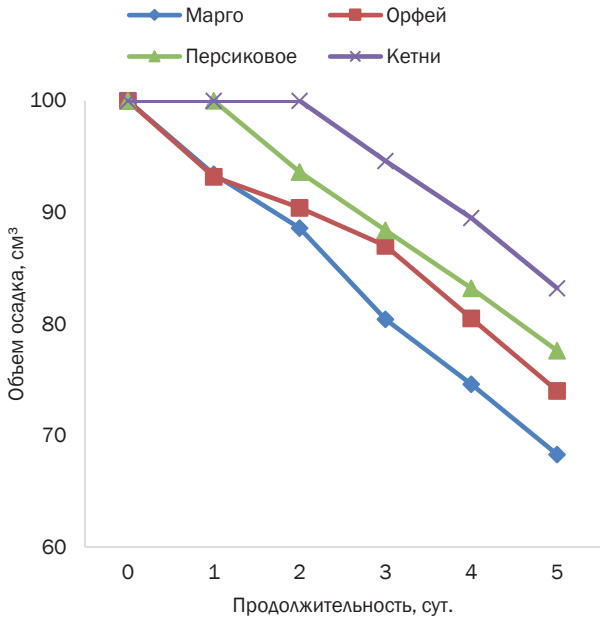


Рис. 5. Динамика уплотнения осадка в присутствии ферментного препарата SQzyme PCL

Fig. 5. Dynamics of sediment compaction in the presence of SQzyme PCL enzyme preparation

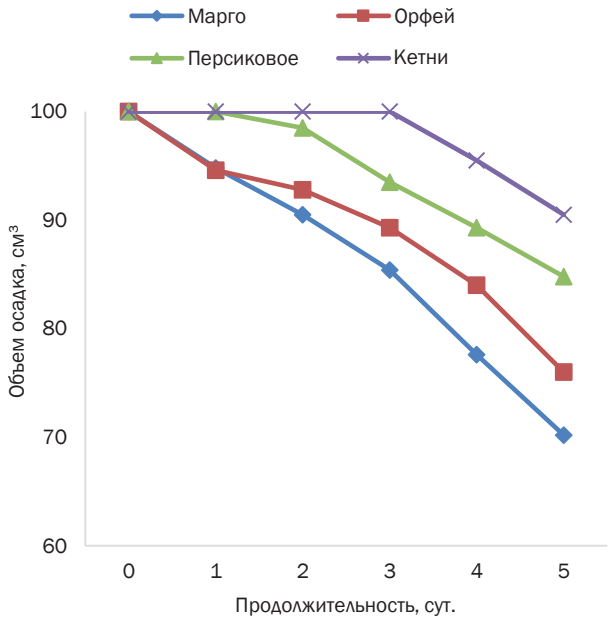


Рис. 6. Динамика уплотнения осадка в присутствии ферментного препарата Фруктоцим Р

Fig. 6. Dynamics of sediment compaction in the presence of Fructozyme R enzyme preparation

Таким образом, представленные экспериментальные данные наглядно свидетельствуют о существенном влиянии сортовых особенностей яблок на динамику осветления свежего яблочного сусла и уплотнения сусловых осадков.

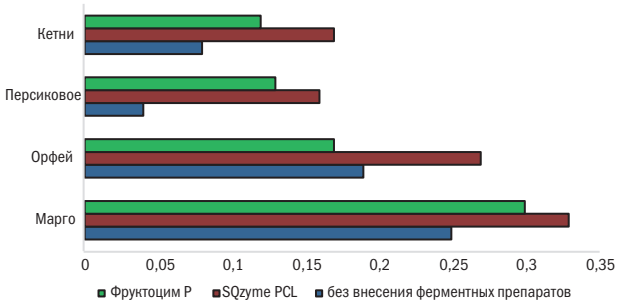


Рис. 7. Средняя скорость уплотнения осадка, см^3/ч

Fig. 7. Average speed of sediment compaction, cm^3/h

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По качеству спонтанного осветления и величине показателя мутности все исследованные сорта яблок можно разделить на две группы: Марго, Джин, Орфей, Экзотика, Либерти, в которых через 8 ч было отмечено активное образование агрегатов, сопровождающееся признаками осветления; Кармен, Персиковое, Амулет, Золотое летнее, Кетни, в которых в течение 32 ч наблюдения сохранялось высокое значение мутности, а также отмечено расслоение жидкости на очень мутную и пюреобразную части. Динамика и скорость уплотнения осадков существенно изменялись в зависимости от сорта яблок, что обусловлено генетическими особенностями каждого сорта. Наибольшая скорость уплотнения осадков установлена при переработке яблок с использованием ферментных препаратов. Так, применение SQzyme PCL привело к наибольшему увеличению скорости уплотнения осадка в свежем яблочном сусле из сортов Персиковое (в 4,0 раза) и Кармен (в 2,9 раза) в сравнении со спонтанным осветлением (без применения ферментных препаратов), что свидетельствует о трансформации сложных комплексов, включающих полисахариды, в том числе пектиновые вещества.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Tarko T., Januszek M., Duda-Chodak A., Sroka P. How keeving determines oenological parameters and concentration of volatile compounds in ciders? // Journal of Food Composition and Analysis. 2021. Vol. 100. P. 103897. DOI: 10.1016/j.jfca.2021.103897.

2. Zhong W., Yuan W., Wang J., Wu Z., Du H., Huang X., et al. Antioxidant and preservation effects of tea polyphenols on apple juice // Food Bioscience. 2024. Vol. 60. P. 104288. DOI: 10.1016/j.fbio.2024.104288.

3. Ташланов Н.Ю., Сайдалиев И.Н. Осветление плодово-ягодных соков обработкой ультразвуком // Вестник Курганского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2015. N 1. С. 70–72. EDN: TXHTLF.

4. Агеева Н.М., Ширшова А.А., Ульяновская Е.В., Храпов А.А., Чернуцкая Е.А. Исследование процесса осветления яблочного сусла с применением различных вспомогательных средств // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2024. N 2. С. 204–218. DOI: 10.30679/2219-5335-2024-2-86-204-218. EDN: MLJZXD.

5. Гнетько Л.В., Неровных Л.П., Удычак М.М., Сиюхова Б.Б., Коблева М.М. Влияние ферментативного катализа на технологические параметры производства яблочных соков // Новые технологии. 2021. Т. 17. N 4. С. 33–41. DOI: 10.47370/2072-0920-2021-17-4-33-41. EDN: WWPDYH.

6. Ozyilmaz G., Gunay E. Clarification of apple, grape and pear juices by co-immobilized amylase, pectinase and cellulase // Food Chemistry. 2023. Vol. 398. P. 133900. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.133900.

7. Zhu D., Zhang Y., Kou C. Ultrasonic and other sterilization methods on nutrition and flavor of cloudy apple juice // Ultrasonics Sonochemistry. 2022. Vol. 84. P. 105975. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2022.105975.

8. Bhattacharya R., Arora S., Ghosh S. Bioprocess optimization for food-grade cellulolytic enzyme production from sorghum waste in a novel solid-state fermentation bioreactor for enhanced apple juice clarification // Journal of Environmental Management. 2024. Vol. 358. P. 120781. DOI: 10.1016/j.jenvman.2024.120781.

9. Kharazmi S., Taheri-Kafrani A., Soozanipour A., Nasrollahzadeh M., Varma R.S. Xylanase immobilization onto trichlorotriazine-functionalized polyethylene glycol grafted magnetic nanoparticles: a thermostable and robust nanobiocatalyst for fruit juice clarification // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. Vol. 163. P. 402–413. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.273.

10. Ladeira Ázar R.I.S., da Luz Morales M., Maitan-Alfenas G.P., Falkoski D.L., Alfenas R.F., Guimarães V.M. Apple juice clarification by a purified polygalacturonase from *Calonectria pteridis* // Food and Bioproducts Processing. 2020. Vol. 119. P. 238–245. DOI: 10.1016/j.fbp.2019.11.013.

11. Агеева Н.М., Ульяновская Е.В., Храпов А.А., Тихонова А.Н., Чернуцкая Е.А. Физико-химические показатели яблок как сырья для производства сидров // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2023. N 2. С. 211–225. DOI: 10.30679/2219-5335-2023-2-80-211-225. EDN: ZKCLCU.

12. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур / ред. Е.Н. Седов, Т.П. Огольцова. Орел: Изд-во ВНИИСПК, 1999. 608 с. EDN: YHAOZT.

13. Zhu D., Kou C., Shen Y., Xi P., Cao X., Liu H., et al. Effects of different processing steps on the flavor and colloidal properties of cloudy apple juice // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2021. Vol. 101, no. 9. P. 3819–3826. DOI: 10.1002/jsfa.11016.

14. Zhu D., Shen Y., Wei L., Xu L., Cao X., Liu H., et al. Effect of particle size on the stability and flavor of cloudy apple juice // Food Chemistry. 2020. Vol. 328. P. 126967. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126967.

15. Padma P.N., Sravani P., Mishra P., Narayan S., Kappagantula A. Synergistic effect of multiple enzymes on apple juice clarification // Indian Journal of Science and Technology. 2017. Vol. 10, no. 10. P. 1–5. DOI: 10.17485/ijst/2017/v10i10/107716.

16. Antón-Díaz M.J., Suárez Valles B., Mangas-Alonso J.J., Fernández-García O., Picinelli-Lobo A. Impact of different techniques involving contact with lees on the volatile composition of cider // Food Chemistry. 2016. Vol. 190. P. 1116–1122. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.06.018.

17. Sharma H.P., Patel H., Sugandha. Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices – a review // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2017.

Vol. 57, no. 6. P. 1215–1227. DOI: 10.1080/10408398.2014.977434.

18. Агеева Н.М., Ширшова А.А., Ульяновская Е.В., Храпов А.А., Чернуцкая Е.А. Исследование процесса осветления яблочного сусла в зависимости от сортов яблони // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2023. N 5. С. 176–187. DOI: 10.30679/2219-5335-2023-5-83-176-187. EDN: TNSUAO.

19. Лычников Д.С., Елизаров Л.Г. Метод определения коллоидно-дисперсного состава жидких пищевых продуктов. М.: Изд-во ЦНИИТЭИ Пищепром, 1983. N 3. 32 с.

20. Mihalev K.R., Dinkova V., Shikov P., Mollov P. Classification of fruit juices // Fruit juices. Extraction, composition, quality and analysis / eds G. Rajauria, B.K. Tiwari. Academic Press, 2018. P. 33–44. DOI: 10.1016/B978-0-12-802230-6.00003-5.

21. Бутова С.Н., Вольнова Е.Р., Николаева Ю.В., Едличкова Я. Усовершенствование технологии плодово-ягодных соков с использованием пектолитических ферментнов // Health, Food & Biotechnology. 2020. Т. 2. N 1. С. 128–139. DOI: 10.36107/hfb.2020.i1.s296. EDN: DUMBEA.

22. Scutarașu E.-C., Luchian C.E., Vlase L., Colibaba L.C., Gheldiu A.M., Cotea V.V. Evolution of phenolic profile of white wines treated with enzymes // Food Chemistry. 2021. Vol. 340. P. 127910. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127910.

23. Lhamo S., Tobgay S., Maya D., Deki S. Study on clarification of apple juice using enzymes // Bhutanese Journal of Agriculture. 2022. Vol. 5, no. 1. P. 183–195. DOI: 10.55925/btagr.22.5115.

24. Enzymes in food technology. Improvements and innovations / ed. M. Kuddus. Singapore: Springer, 2018. 419 p. DOI: 10.1007/978-981-13-1933-4.

25. Li Q., Qin C., Chen X., Hu K., Li J., Liu A., et al. Enhancing the acid stability of the recombinant GH11 xylanase xynA through N-terminal substitution to facilitate its application in apple juice clarification // International Journal of Biological Macromolecules. 2024. Vol. 268. Pt. 1. P. 131857. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131857.

REFERENCES

1. Tarko T., Januszek M., Duda-Chodak A., Sroka P. How keeving determines oenological parameters and concentration of volatile compounds in ciders? *Journal of Food Composition and Analysis*. 2021;100:103897. DOI: 10.1016/j.jfca.2021.103897.

2. Zhong W., Yuan W., Wang J., Wu Z., Du H., Huang X., et al. Antioxidant and preservation effects of tea polyphenols on apple juice. *Food Bioscience*. 2024;60:104288. DOI: 10.1016/j.fbio.2024.104288.

3. Tashlanov N.Y., Saydaliev I.N. Ultrasound clarification of fruit juice. *Vestnik Kurganskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Estestvennye nauki*. 2015;1:70-72. (In Russian). EDN: TXHTLF.

4. Ageyeva N.M., Shirshova A.A., Ulyanovskaya E.V., Khrapov A.A., Chernutskaya E.A. Studying of clarification process of apple must using various technological means. *Fruit growing and viticulture of South Russia*. 2024;2:204-218. (In Russian). DOI: 10.30679/2219-5335-2024-2-86-204-218. EDN: MLJZXD.

5. Gnetko L.V., Nerovnykh L.P., Udychak M.M., Siyukhova B.B., Kobleva M.M. Influence of enzymative catalysis on technological parameters of apple juice production. *New technologies*. 2021;17(4):33-41. (In Russian). DOI: 10.47370/2072-0920-2021-17-4-33-41. EDN: WWPDYH.

6. Ozyilmaz G., Gunay E. Clarification of apple, grape and pear juices by co-immobilized amylase, pectinase and cellulose. *Food Chemistry*. 2023;398:133900. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.133900.

7. Zhu D., Zhang Y., Kou C. Ultrasonic and other sterilization methods on nutrition and flavor of cloudy apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2022;84:105975. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2022.105975.

8. Bhattacharya R., Arora S., Ghosh S. Bioprocess optimization for food-grade cellulolytic enzyme production from sorghum waste in a novel solid-state fermentation bioreactor for enhanced apple juice clarification. *Journal of Environmental Management*. 2024;358:120781. DOI: 10.1016/j.jenvman.2024.120781.

9. Kharazmi S., Taheri-Kafrani A., Soozanipour A., Nasrollahzadeh M., Varma R.S. Xylanase immobilization onto trichlorotriazine-functionalized polyethylene glycol grafted magnetic nanoparticles: a thermostable and robust nanobiocatalyst for fruit juice clarification. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;163:402-413. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.273.

10. Ladeira Ázar R.I.S., da Luz Morales M., Maitan-Alfenas G.P., Falkoski D.L., Alfenas R.F., Guimarães V.M. Apple juice clarification by a purified polygalacturonase from *Calonectria pteridis*. *Food and Bioproducts Processing*. 2020;119:238-245. DOI: 10.1016/j.fbp.2019.11.013.

11. Ageyeva N.M., Ulyanovskaya E.V., Khrapov A.A., Tikhonova A.N., Chernutskaya E.A. Physical and chemical indicators of apples as raw materials for the production of ciders. *Fruit growing and viticulture of the South of Russia*. 2023;2:211-225. (In Russian). DOI: 10.30679/2219-5335-2023-2-80-211-225. EDN: ZKCLCU.

12. Sedov E.N., Ogol'cova T.P. *Program and methodology for studying varieties of fruit, berry and nut crops*. Orel: All-Russian Scientific Research Institute of Fruit Crop Breeding; 1999, 608 p. (In Russian). EDN: YHAOZT.

13. Zhu D., Kou C., Shen Y., Xi P., Cao X., Liu H., et al. Effects of different processing steps on the flavor and colloidal properties of cloudy apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021;101(9):3819-3826. DOI: 10.1002/jsfa.11016.

14. Zhu D., Shen Y., Wei L., Xu L., Cao X., Liu H., et al. Effect of particle size on the stability and flavor of cloudy apple juice. *Food Chemistry*. 2020;328:126967. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126967.

15. Padma P.N., Sravani P., Mishra P., Narayan S., Kappagantula A. Synergistic effect of multiple enzymes on apple juice clarification. *Indian Journal of Science and Technology*. 2017;10(10):1-5. DOI: 10.17485/ijst/2017/v10i10/107716.

16. Antón-Díaz M.J., Suárez Valles B., Mangas-Alonso J.J., Fernández-García O., Picinelli-Lobo A. Impact of different techniques involving contact with lees on the volatile composition of cider. *Food Chemistry*. 2016;190:1116-1122. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.06.018.

17. Sharma H.P., Patel H., Sugandha. Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices – a review. *Critical*

Reviews in Food Science and Nutrition. 2017;57(6):1215-1227. DOI: 10.1080/10408398.2014.977434.

18. Ageyeva N.M., Shirshova A.A., Ulyanovskaya E.V., Khrapov A.A., Chernutskaya E.A. Study of the clarification of apple must depending on the apple varieties. *Fruit growing and viticulture of South Russia.* 2023;5:176-187. (In Russian). DOI: 10.30679/2219-5335-2023-5-83-176-187. EDN: TNSUAO.

19. Lychnikov D.S., Elizarov L.G. *Method for determining the colloidal dispersed composition of liquid food products*. Moscow: Central Scientific Research Institute of Information and Technical and Economic Research of the Food Industry; 1983, no. 3, 32 p. (In Russian).

20. Mihalev K.R., Dinkova V., Shikov P., Mollov P. Classification of fruit juices. In: Rajauria G., Tiwari B.K. (eds). *Fruit juices. Extraction, composition, quality and analysis*. Academic Press; 2018, p. 33-44. DOI: 10.1016/B978-0-12-802230-6.00003-5.

21. Butova S.N., Volnova E.R., Nikolaeva Yu.V., Jedlickova Ja. Improvement of fruit-berry juices technology using pectolytic enzymes. *Health, Food & Biotechnology*. 2020;2(1):128-139. (In Russian). DOI: 10.36107/hfb.2020.i1.s296. EDN: DUMBEA.

22. Scutarașu E.-C., Luchian C.E., Vlase L., Colibaba L.C., Gheldiu A.M., Cotea V.V. Evolution of phenolic profile of white wines treated with enzymes. *Food Chemistry*. 2021;340:127910. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127910.

23. Lhamo S., Tobgay S., Maya D., Deki S. Study on clarification of apple juice using enzymes. *Bhutanese Journal of Agriculture*. 2022;5(1):183-195. DOI: 10.55925/btagr.22.5115.

24. Kuddus M. Enzymes in food technology. Improvements and innovations. Singapore: Springer; 2018, 419 p. DOI: 10.1007/978-981-13-1933-4.

25. Li Q., Qin C., Chen X., Hu K., Li J., Liu A., et al. Enhancing the acid stability of the recombinant GH11 xylanase xynA through N-terminal substitution to facilitate its application in apple juice clarification. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;268:131857. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131857.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Агеева Наталья Михайловна,
д.т.н., профессор,
главный научный сотрудник,
Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградства, виноделия,
350072, г. Краснодар, ул. 40-летия Победы, 39,
Российская Федерация,
ageyeva@inbox.ru
https://orcid.org/0000-0002-9165-6763

Ширшова Анастасия Александровна,
к.т.н., старший научный сотрудник,
Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградства, виноделия,
350072, г. Краснодар, ул. 40-летия Победы, 39,
Российская Федерация,
✉ anastasiya_1987@inbox.ru
https://orcid.org/0000-0003-1428-5935

Храпов Антон Александрович,
научный сотрудник,
Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградства, виноделия,
350072, г. Краснодар, ул. 40-летия Победы, 39,
Российская Федерация,
hrapov-anton@bk.ru
https://orcid.org/0000-0001-6436-1970

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalia M. Ageyeva,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Chief Researcher,
North Caucasian Federal Scientific Centre
of Horticulture, Viticulture, Wine-making,
39, 40-letiia Pobedy St., Krasnodar,
350072, Russian Federation,
ageyeva@inbox.ru
https://orcid.org/0000-0002-9165-6763

Anastasia A. Shirshova,
Cand. Sci. (Engineering), Senior Researcher,
North Caucasian Federal Scientific Centre
of Horticulture, Viticulture, Wine-making,
39, 40-letiia Pobedy St., Krasnodar,
350072, Russian Federation,
✉ anastasiya_1987@inbox.ru
https://orcid.org/0000-0003-1428-5935

Anton A. Khrapov,
Researcher,
North Caucasian Federal Scientific Centre
of Horticulture, Viticulture, Wine-making,
39, 40-letiia Pobedy St., Krasnodar,
350072, Russian Federation,
hrapov-anton@bk.ru
https://orcid.org/0000-0001-6436-1970

Вклад авторов

Н.М. Агеева – научное руководство, разработка концепции, административное руководство исследовательским проектом, написание черновика рукописи.
А.А. Ширшова – проведение исследования, визуализация, редактирование рукописи, курирование данных.
А.А. Храпов – предоставление ресурсов, валидация результатов, формальный анализ.

Contribution of the authors

Natalia M. Ageyeva – supervision, conceptualization, project administration, writing – original draft.
Anastasia A. Shirshova – investigation, visualization, data curation, editing.
Anton A. Khrapov – resources, validation, formal analysis.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

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

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

Информация о статье

Поступила в редакцию 30.05.2024.
Одобрена после рецензирования 11.09.2024.
Принята к публикации 31.05.2025.

Information about the article

The article was submitted 30.05.2024.
Approved after reviewing 11.09.2024.
Accepted for publication 31.05.2025.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 663.34
EDN: IIOTHO
DOI: 10.21285/achb.977

Крепленый алкогольный напиток типа портвейн из плодов груши уссурийской

К.Р. Иванова✉, Е.А. Привалова

Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. *Сибирский регион богат плодово-ягодным сырьем, возможности использования которого в виноделии недооценены. Целью данной работы является оценка пригодности плодов груши уссурийской (Pyrus ussuriensis Maxim.), произрастающей на территории Южного Прибайкалья, для производства плодового алкогольного напитка типа портвейн. Плоды груши уссурийской обладают терпким кисло-сладким вкусом, достаточно хорошо выраженным сортовым ароматом с медовыми и цветочными оттенками. Существенной особенностью мелкоплодных груш Сибирского региона является значительное содержание экстрактивных веществ и полифенольных соединений, что позволяет рассматривать их как подходящее сырье для выработки крепленых десертных винных напитков. Объектом исследования служило сусло, полученное из плодов груши уссурийской с содержанием сахара 16,3 г/см^3. Плодовые напитки были получены по ускоренной технологии, включающей кондиционирование сусла по содержанию титруемых кислот и сахаров, подбраживание сусла, закрепление подброженного плодового материала и тепловую обработку последнего в присутствии щепы дуба, яблони, груши и скорлупы кедрового ореха. Тепловая обработка проводилась путем трехкратного нагревания плодового материала до 60 °С в течение 30 ч с последующим охлаждением до 15 °С. Полученные крепленые плодовые напитки по большинству физико-химических показателей соответствовали требованиям ГОСТ Р 58013-2017 «Напитки винные фруктовые. Общие технические условия», обладали хорошо выраженным грушевым ароматом, высокой прозрачностью и медовым цветом. Наиболее высоко с органолептической точки зрения был оценен образец напитка, полученный с использованием скорлупы кедрового ореха. Таким образом, можно заключить, что плоды груши уссурийской являются перспективным сырьем для выработки крепленого плодового напитка типа портвейн.*

Ключевые слова: *груша уссурийская, плодовый крепленый напиток, древесная щепа, скорлупа кедрового ореха, портвейнизация, органолептический анализ*

Для цитирования: Иванова К.Р., Привалова Е.А. Крепленый алкогольный напиток типа портвейн из плодов груши уссурийской // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 207–212. DOI: 10.21285/achb.977. EDN: IIOTHO.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Port-like fortified alcoholic beverage produced from Ussurian pear fruit

Kristina R. Ivanova✉, Elena A. Privalova

Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russia

Abstract. *The Siberian region abounds in fruit and berries, whose potential for use in winemaking is underestimated. The present study aims to assess the suitability of Ussurian pear fruit (Pyrus ussuriensis Maxim.) growing in the South Baikal region for the production of a port-like alcoholic fruit beverage. Ussurian pear fruit has a sweet-sour, astringent*

© Иванова К.Р., Привалова Е.А., 2025

flavor and a fairly distinctive aroma with honey and floral notes. An essential characteristic of small-fruited pears in the Siberian region is the significant levels of extractive substances and polyphenolic compounds, which makes them suitable raw materials for the production of fortified dessert vinous beverages. The subject matter of the study was wort obtained from Ussurian pear fruit, having a sugar content of 16.3 g/cm³. Fruit beverages were obtained using an accelerated technology, which included wort conditioning in terms of titratable acidity and sugar levels, wort fermentation, fortification of the fermented fruit material, and thermal treatment of the latter in the presence of oak, apple, and pear chips and pine nut shells. The thermal treatment was performed by heating the fruit material three times to 60 °C for 30 h, followed by cooling to 15 °C. The obtained fortified fruit beverages met the requirements of GOST R 58013-2017 Fruit Wine Drinks. General Specifications in terms of most physicochemical parameters and had a distinctive pear aroma, high transparency, and honey color. The best organoleptic characteristics were achieved in the beverage sample obtained using pine nut shells. Thus, Ussurian pear fruit has high potential as a raw material for producing a port-like fortified fruit beverage.

Keywords: *Ussurian pear, fortified fruit beverage, wood chips, pine nut shells, port winemaking, organoleptic analysis*

For citation: Ivanova K.R., Privalova E.A. Port-like fortified alcoholic beverage produced from Ussurian pear fruit. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2):207-212. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.977. EDN: IIOTHO.

ВВЕДЕНИЕ

Ассортимент алкогольной продукции, вырабатываемой из плодового сырья, в основном ограничивается слабоалкогольными напитками с содержанием спирта до 9–12% об. В то же время известно, что плодовые культуры могут быть использованы для производства крепленых напитков, ассортимент которых в настоящее время ограничен. Сибирский регион обладает значительным потенциалом сырья, пригодного для изготовления плодовых алкогольных напитков, в том числе с повышенной объемной долей этилового спирта.

Одним из перспективных видов сырья является мелкоплодная груша уссурийская (Pyrus ussuriensis Maxim.), культивируемая в Иркутской области. Плоды груши уссурийской обладают терпким кисло-сладким вкусом, достаточно хорошо выраженным сортовым ароматом с медовыми и цветочными оттенками [1]. Благодаря высокому содержанию в них биологически активных веществ, это сырье пригодно для производства плодовых соков, сидров и тихих плодовых вин [2], что было отмечено уже более 70 лет назад в работах Н.К. Могилянского [3].

Существенной особенностью мелкоплодных груш Сибирского региона является значительное содержание полифенольных соединений [4–6], которые ответственны за терпкий вкус плодов. Комплекс фенольных соединений существенно влияет на цвет и вкусовые характеристики вина [7–10]. Наличие в сырье фенольных соединений в количестве не менее 0,5 г/дм³ является необходимым условием для получения специальных вин типа портвейна и мадеры [11]. Кроме того, плоды груши уссурийской содержат достаточное количество аминокислот и экстрактивных веществ [1], что позволяет рассматривать их как подходящее сырье для выработки крепленых винных напитков по типу портвейна.

Органолептические качества вин типа портвейн и мадера формируются в результате тепловой обработки крепленого виноматериала в контакте с дубовой клепкой, которая является источником целого ряда специфических соединений, положительно влияющих на качество напитка. Дефицитность дуба побуждает использовать альтернативные породы древесины, такие как яблоня, вишня, слива [12]. В качестве перспективного вида древесного сырья можно рассматривать также скорлупу кедрового ореха, представляющую собой многотоннажный отход производства кедрового масла.

В связи с вышесказанным целью проведенного исследования являлась оценка возможности производства плодового алкогольного напитка типа портвейн из сока плодов груши уссурийской.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования служило сусло, полученное из плодов груши уссурийской (*Pyrus ussuriensis* Maxim.) урожая 2023 г., собранных в Иркутской области. Плоды собирали в стадии технологической зрелости, сортировали, отделяя незрелые и поврежденные. Перед переработкой плоды промывали в проточной воде с целью удаления с поверхности сырья загрязнений, ядохимикатов, механических примесей и микроорганизмов. Мезга, полученная в результате дробления плодов, сразу подвергалась прессованию. Консервацию сусла обеспечивали внесением 100 мг/дм³ метабисульфита калия.

Полученное сусло кондиционировали по кислотности и сахаристости с помощью воды и сахарного сиропа с концентрацией 65% сухих веществ. В кондиционированное сусло вносили винные активные сухие дрожжи Safsidre AB-1 рода *Saccharomyces bayanus* из расчета 1 г/дм³ и осуществляли брожение при 25 °С до достижения концентрации сахара 15 г/100 см³. Брожение останавливали спиртованием. Для обеспечения желаемой объемной доли этилового спирта 15% об. применяли этиловый ректификованный спирт сорта «Экстра». Крепленый плодовый материал подвергали выдержке (отдыху) в течение 10 дней, после чего декантировали с осадка, центрифугировали и направляли на портвейнизацию ускоренным методом по схеме, приведенной на рисунке. Указанный цикл повторяли трижды.

В качестве дополнительного источника экстрактивных веществ, способствующих формированию органолептических свойств портвейна, использовали щепу яблони, груши и дуба, а также скорлупу кедрового ореха, полученную с помощью калибровочно-дробильного аппарата при производстве кедрового масла. Лигноцеллюлозные материалы предварительно обрабатывали по методике, изложенной в работах [13, 14], с целью частичной делигнификации и удаления смолистых веществ. Скорлупу кедрового ореха перед обработкой

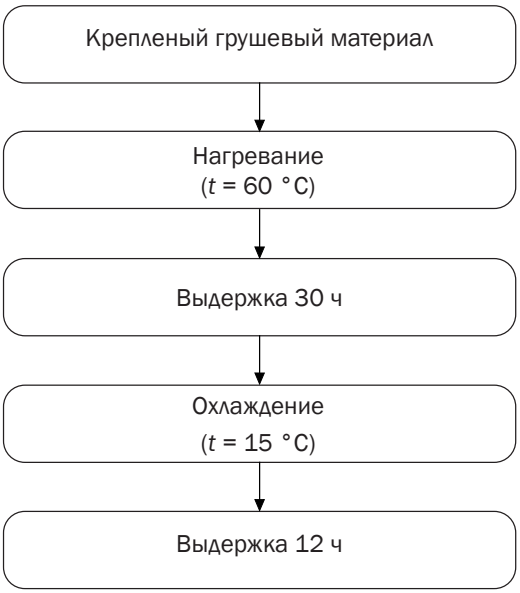


Схема портвейнизации крепленого плодового материала

Scheme of fruit port wine making

дополнительно очищали от пленок и остатков ядер кедрового ореха. Древесную щепу и скорлупу кедрового ореха вносили в крепленый плодовый материал из расчета 2 г/дм^3.

Физико-химические показатели сусла, сброженного плодового материала и плодовых крепленых напитков определяли методами, принятыми в виноделии [15]. Органолептическую оценку полученных крепленых плодовых напитков проводили в соответствии с ГОСТ 32051-2013[1].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Характеристика сусла, полученного из плодов груши уссурийской, представлена в таблице. Сусло обладает достаточным потенциалом экстрактивных веществ, аминокислот и полифенолов, что позволяет рассматривать его как перспективное сырье для производства крепленых плодовых алкогольных напитков [11]. Вместе с тем повышенное содержание титруемых кислот и низкий сахарокислотный индекс, характерные для плодового сырья Восточной Сибири [1, 5], предопределяют необходимость предварительной корректировки его состава по указанным показателям. Для нормального развития дрожжей и сбраживания сахаров необходимо иметь кислотность не выше 8–10 г/дм^3 [16]. В соответствии с этим исходное сусло подвергали кондиционированию, а затем подбраживали в течение 2 суток, после чего брожение останавливали спиртованием.

Крепленые плодовые напитки, полученные после портвейнизации с использованием щепы различных древесных пород и скорлупы кедрового ореха, по большинству нормируемых показателей соответствуют ГОСТ Р 58013-2017[2] (см. таблицу). Исключение составляет

Характеристика грушевого сусла и крепленых плодовых напитков типа портвейн, полученных на его основе

Characteristics of pear must and fortified fruit wine obtained from it

Образец сусла (плодового напитка)	Физико-химические показатели						Средний балл дегустационной оценки
	Массовая концентрация титруемых кислот, г/дм^3	Массовая концентрация сахаров, г/100 см^3	Массовая концентрация полифенольных соединений, мг/дм^3	Массовая концентрация аминного азота, мг/дм^3	Массовая концентрация приведенного экстракта, г/дм^3	Объемная доля этилового спирта, % об.	
Сусло исходное	18,7±1,0	16,3±0,5	1936±1,0	600±1,0	38,9±0,1	–	–
Сусло кондиционированное	10,0±1,0	18,0±0,5	1837±1,0	575±1,0	38±0,1	–	–
Сусло подброженное	10,3±1,0	15,1±0,5	1778±1,0	520±1,0	37±0,1	2,0±0,5	–
Плодовый крепленый материал	12,8±1,0	12,8±0,5	1427±1,0	475±1,0	23±0,1	15,4±0,5	5,9
Плодовый крепленый напиток 1*	10,6±1,0	11,5±0,5	1288±1,0	425±1,0	25±0,1	15,6±0,5	8,2
Плодовый крепленый напиток 2*	10,4±1,0	12,6±0,5	1093±1,0	485±1,0	25±0,1	15,5±0,5	7,0
Плодовый крепленый напиток 3*	10,0±1,0	11,9±0,5	1247±1,0	425±1,0	27±0,1	15,3±0,5	7,0
Плодовый крепленый напиток 4*	10,65±1,0	11,9±0,5	1328±1,0	420±1,0	29±0,1	15,6±0,5	7,9
ГОСТ Р 58013-2017	3,5±1,0	4–300**	Не норм.	Не норм.	Не норм.	Не более 22	–
Портвейн белый ООО «Массандра» (Республика Крым)	6,8±1,0	5,6±0,5	1898±1,0	455±1,0	35±0,1	17,0±0,5	8,6

Примечание. * – образцы получены с использованием: 1 – скорлупы кедрового ореха, 2 – щепы яблони, 3 – щепы груши, 4 – щепы дуба; ** – для разных типов напитков.

[1] ГОСТ 32051-2013. Продукция винодельческая. Методы органолептического анализа. М.: Стандартинформ, 2019. 13 с.
[2] ГОСТ Р 58013-2017. Напитки винные фруктовые. Общие технические условия. М.: Стандартинформ, 2019. 15 с.

титруемая кислотность, которая в процессе сбраживания сусла и тепловой обработки плодового материала изменилась незначительно и составила 10,0–10,6 г/дм^3. Приведенный экстракт полученных напитков соответствует уровню, рекомендуемому для белых портвейнов [11].

В крепленых напитках наблюдается снижение содержания сахаров, аминокислот и полифенольных соединений по сравнению с подброженным суслом и крепленым плодовым материалом, что, по всей видимости, обусловлено их взаимодействием с образованием меланоидинов, а также карамелизацией сахаров, активно происходящими при повышенных температурах и в присутствии этилового спирта [11, 17]. Качественные показатели крепленых плодовых напитков, полученных с использованием разных лигноцеллюлозных материалов, незначительно отличаются друг от друга.

Полученные напитки по большинству физико-химических показателей сравнимы с белым виноградным портвейном производства ООО «Массандра» (Республика Крым). Исключение составляет повышенная кислотность, для снижения которой следует, очевидно, применять специальные технологические приемы на стадии получения и сбраживания сусла [18–20].

Органолептическая оценка полученных образцов крепленых плодовых напитков показала, что для них характерен выраженный грушевый аромат, в образце 1, приготовленном с использованием скорлупы кедрового ореха, отмечены ореховые нотки, в образце 4 – древесные оттенки аромата. Во всех образцах отмечена хорошая ассимиляция спирта, приятный вкус с выраженной кислотностью и некоторой терпкостью. Напитки обладали высокой прозрачностью и приятным желто-медовым цветом, наиболее хорошо выраженным в образце 1. Наиболее высоко с органолептической точки зрения был оценен грушевый крепленый напиток, полученный с использованием скорлупы кедрового ореха.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет заключить, что груша уссурийская является перспективным сырьем для получения крепленой алкогольной продукции, в частности напитков типа портвейн. Сусло из плодов груши уссурийской содержит необходимое количество экстрактивных веществ, аминокислот и полифенольных соединений для формирования органолептических свойств белого портвейна. Ускоренный метод портвейнизации крепленого плодового материала с использованием щепы дуба, яблони и груши, а также скорлупы кедрового ореха позволяет получить напитки с выраженным грушево-фруктовым ароматом, высокой прозрачностью и благородным медовым цветом. Повышенная кислотность грушевого сусла должна быть скорректирована на технологических стадиях, предшествующих тепловой выдержке крепленого плодового материала, одним из доступных способов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Гусакова Г.С., Евстафьев С.Н. Перспективы использования плодов уссурийской груши в виноделии // Химия растительного сырья. 2011. N 3. С. 173–178. EDN: OHSUTB.

2. Верхотуров Д.Г., Байкова Г.Н. Минеральный и витаминный состав плодов груши в разных зонах Красноярского края // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2009. N 3. С. 22–27. EDN: JXSZTP.

3. Могилянский Н.К. Плодовое и ягодное виноделие. М.: Пищепромиздат, 1954. 180 с.

4. Скороспелова Е.В. Ароматизированные сортовые и купажные вина из груш сибирского сортимента // Пища. Экология. Качество: труды XIV Междунар. науч.-практ. конф. (г. Новосибирск, 8–10 ноября 2017 г.). Новосибирск: Издательский центр «Золотой колос» Новосибирского государственного аграрного университета, 2017. Т. II. С. 201–204. EDN: YLEEPA.

5. Шелковская Н.К. Сорта плодовых и ягодных культур сибирской селекции как сырье для вин столового типа // Ползуновский вестник. 2019. N 1. С. 59–63. EDN: ZSFKZN.

6. Скороспелова Е.В., Шелковская Н.К. Изменение биохимического состава грушевых соков в процессе приготовления ароматизированных виноматериалов // Вестник алтайской науки. 2015. N 1. С. 479–482. EDN: SAMZID.

7. Han G., Dai L., Sun Y., Li C., Ruan S., Li J., et al. Determination of the age of dry red wine by multivariate techniques using color parameters and pigments // Food Control. 2021. Vol. 129. P. 108253. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.108253.

8. Li S.-Y., Zhu B.-Q., Li L.-J., Duan C.-Q. Extensive and objective wine color classification with chromatic database and mathematical models // International Journal of Food Properties. 2017. Vol. 20, no. sup. 3. P. S2647–S2659. DOI: 10.1080/10942912.2017.1381848.

9. Carvalho M.J., Pereira V., Pereira A.C., Pinto J.L., Marques J.C. Evaluation of wine colour under accelerated and oak-cask ageing using CIELab and chemometric approaches // Food and Bioprocess Technology. 2015. Vol. 8. P. 2309–2318. DOI: 10.1007/s11947-015-1585-x.

10. Аникина Н.С., Червяк С.Н., Гниломедова Н.В. Методы оценки цвета вин. Обзор // Аналитика и контроль. 2019. Т. 23. N 2. С. 158–167. EDN: ZYKSPJ. DOI: 10.15826/analitika.2019.23.2.003.

11. Валуйко Г.Г. Технология виноградных вин. Симферополь: Таврида, 2001. 624 с.

12. Захаров М.А. Изучение физико-химического состава древесины сливы и вишни в рамках оценки их пригодности для выдержки плодовых // Наука России: цели и задачи: сборник науч. тр. по материалам XIV Междунар. науч. конф. (г. Екатеринбург, 10 апреля 2019 г.). Екатеринбург: НИЦ «Л-Журнал», 2019. Ч. 4. С. 71–74. DOI: 10.18411/sr-10-04-2019-77. EDN: NKVUXS.

13. Пат. 2783427, Российская Федерация, МПК C12G1/00, C12G3/08. Способ производства белого яблочного вина / Н.П. Супрун, В.В. Пулди, Г.С. Гусакова, С.Н. Евстафьев. Заявл. 16.08.2021; опубл. 14.11.2022. Бюл. № 32.

14. Егорова Е.Ю., Митрофанов Р.Ю., Лебедева А.А. Получение сорбента из скорлупы кедрового ореха методом низкотемпературной обработки // Ползуновский вестник. 2007. N 3. С. 35–39. EDN: KZCLDN.

15. Методы технохимического контроля в виноделии / под ред. В.Г. Гержиковой. Симферополь: Таврида, 2009. 304 с. EDN: XXXILL.

16. Вечер А.С., Юрченко Л.А. Сидры и яблочные игристые вина. М.: Пищевая промышленность, 1976. 135 с.

17. Родопуло А.К. Основы биохимии виноделия. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 239 с.

18. Супрун Н. П. Влияние сорбента из скорлупы кедрового ореха на состав органических кислот и летучих компонентов яблочных вин // Вестник КрасГАУ. 2023. N 8. С. 266–272. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-8-266-272. EDN: NBRMNF.

19. Иванова К.Р., Привалова Е.А. Скорлупа кедрового ореха как сорбент в плодово-ягодном виноделии // Вестник МГТУ. 2024. Т. 27. N 4. С. 621–630. DOI: 10.21443/1560-9278-2024-27-4-621-630. EDN: MIJMJG.

20. He W., Liu S., Heponiemi P., Heinonen M., Marsol-Vall A., Ma X., et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* strains on chemical composition and sensory quality of ciders made from Finnish apple cultivars // Food Chemistry. 2021. Vol. 345. P. 128833. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128833.

REFERENCES

1. Gusakova G.S., Evstaf'ev S.N. Prospects for using Ussuri pear fruits in winemaking. *Chemistry of plant raw material.* 2011;3:173-178. (In Russian). EDN: OHSUTB.

2. Verkhoturov D.G., Baykova G.N. Mineral and vitamin composition of pear fruits in different zones of the Krasnoyarsk territory. *Bulletin of Altai State Agricultural University.* 2009;3:22-27. (In Russian). EDN: JXSZTP.

3. Mogilyansky N.K. *Fruit and berry winemaking*. Moscow: Pishchepromizdat; 1954, 180 p. (In Russian).

4. Skorospelova E.V. Aromatized varietal and blended wines from Siberian pears. In: *Pishcha. Ekologiya. Kachestvo: trudy XIV Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. = Food. Ecology. Quality: Proc. 14th Int. Sci. and Pract. Conf.* 8–10 November 2017, Novosibirsk. Novosibirsk: Zolotoi kolos, Publishing Center of the Novosibirsk State Agrarian University; 2017, vol. 2, p. 201-204. (In Russian). EDN: YLEEPA.

5. Shelkovskaya N.K. Fruit and berry varieties of Siberian selection as raw materials for table wines. *Polzunovskiy vestnik*. 2019;1:59-63. (In Russian). EDN: ZSFKZN.

6. Skorospelova E.V., Shelkovskaya N.K. Changing the biochemicalcomposition of pear juice during cooking aromatizd wine. *Vestnik altaiskoi nauki*. 2015;1:479-482. (In Russian). EDN: SAMZID.

7. Han G., Dai L., Sun Y., Li C., Ruan S., Li J., et al. Determination of the age of dry red wine by multivariate techniques using color parameters and pigments. *Food Control*. 2021;129:108253. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.108253.

8. Li S.-Y., Zhu B.-Q., Li L.-J., Duan C.-Q. Extensive and objective wine color classification with chromatic database and mathematical models. *International Journal of Food Properties*. 2017;20(sup.3):S2647-S2659. DOI: 10.1080/10942912.2017.1381848.

9. Carvalho M.J., Pereira V., Pereira A.C., Pinto J.L., Marques J.C. Evaluation of wine colour under accelerated and oak-cask ageing using CIELab and chemometric approaches. *Food and Bioprocess Technology*. 2015;8:2309-2318. DOI: 10.1007/s11947-015-1585-x.

10. Anikina N.S., Cherviak S.N., Gnilomedova N.V. Methods for evaluating the color of wines. The review. 2019;23(2):158-167. (In Russian). DOI: 10.15826/analitika.2019.23.2.003. EDN: ZYKSPJ.

11. Valuiko G.G. *Technology of grape wines*. Simferopol: Tavrida; 2001, 624 p. (In Russian).

12. Zakharov M.A. Study of the physico-chemical composition of plum and cherry wood in the framework of assessing their suitability for aging fruit distillates. In: *Nauka Rossii: tseli i zadachi: sbornik nauch. tr. po materialam XIV Mezhdunar. nauch. konf. = Russian Science: Goals and objectives: Proc. 14th Int. Sci. Conf.* 10 April 2019, Ekaterinburg. Ekaterinburg: L-Zhurnal; 2019, pt. 4, p. 71-74. (In Russian). DOI: 10.18411/sr-10-04-2019-77. EDN: NKVUXS.

13. Suprun N.P., Puldi V.V., Gusakova G.S., Evstaf'ev S.N. *Method for production white apple wine*. Patent RU, no. 2783427; 2022. (In Russian).

14. Egorova E.Yu., Mitrofanov R.Yu., Lebedeva A.A. Low temperature preparation of sorbent from cedar nut shell. *Polzunovskiy vestnik*. 2007;3:35-39. (In Russian). EDN: KZCLDN.

15. Gerzhikova V.G. *Methods of technical chemistry control in winemaking*. Simferopol: Tavrida; 2009, 304 p. (In Russian). EDN: XXXILL.

16. Vecher A.S., Yurchenko L.A. *Ciders and sparkling apple wines*. Moscow: Pishchevaya promyshlennost'; 1976, 135 p. (In Russian).

17. Rodopulo A.K. *Fundamentals of biochemistry of winemaking*. Moscow: Legkaya i pishchevaya promyshlennost'; 1983, 239 p. (In Russian).

18. Suprun N.P. Pine nuts shell sorbent influence on the organic acids composition and apple wines volatile components. *Bulletin of KSAU*. 2023;8:266-272. (In Russian). DOI: 10.36718/1819-4036-2023-8-266-272. EDN: NBRMNF.

19. Ivanova K.R., Privalova E.A. Pine nut shell as a sorbent in fruit winemaking. *Vestnik of MSTU*. 2024;27(4):621-630. (In Russian). DOI: 10.21443/1560-9278-2024-27-4-621-630. EDN: MIJMJG.

20. He W., Liu S., Heponiemi P., Heinonen M., Marsol-Vall A., Ma X., et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* strains on chemical composition and sensory quality of ciders made from Finnish apple cultivars. *Food Chemistry*. 2021;345:128833. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128833.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванова Кристина Радиковна,
аспирант,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ kristinochka_iskakova@mail.ru
https://orcid.org/0009-0001-9353-1075

Привалова Елена Андреевна,
к.х.н., доцент, доцент,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
epriv@istu.edu
https://orcid.org/0009-0005-7307-3117

Вклад авторов

К.Р. Иванова – проведение исследования, курирование данных, валидация результатов, визуализация.
Е.А. Привалова – разработка концепции, разработка методологии, формальный анализ, написание черновика рукописи, редактирование рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 08.04.2025.
Одобрена после рецензирования 25.05.2025.
Принята к публикации 31.05.2025.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Kristina R. Ivanova,
Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ kristinochka_iskakova@mail.ru
https://orcid.org/0009-0001-9353-1075

Elena A. Privalova,
Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
epriv@istu.edu
https://orcid.org/0009-0005-7307-3117

Contribution of the authors

Kristina R. Ivanova – investigation, data curation, validation, visualization.
Elena A. Privalova – conceptualization, methodology, formal analysis, writing – original draft, editing.

Conflict of interest

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 08.04.2025.
Approved after reviewing 25.05.2025.
Accepted for publication 31.05.2025.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 579.6
EDN: SQKPVO
DOI: 10.21285/achb.978

Штамм *Gordonia amicalis* G2 – продуцент поверхностно-активных веществ биологического происхождения

И.А. Нечаева*✉, А.Н. Осина*, А.С. Филиппова*, Н.В.Т. Нам, Л.Т. Мо****

**Тульский государственный университет, Тула, Российская Федерация*
***Южное отделение Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра, Хо-Ши-Минь, Вьетман*

Аннотация. *Целью проведенного исследования являлось изучение способности нового штамма-деструктора парафинов Gordonia amicalis G2, выделенного из загрязненного песка морского порта во Вьетнаме, продуцировать биосурфактанты. Мониторинг продукции биосурфактантов штаммом Gordonia amicalis G2 проводили в процессе роста бактерий при периодическом культивировании с использованием гексадекана в качестве ростового субстрата. Эффективность действия продуцируемых биосурфактанов оценивали с помощью поверхностного и межфазного натяжения. Поверхностное и межфазное натяжение растворов биосурфактантов определяли методом отрыва кольца де Нуи с использованием тензиометра Kruss K6. Поверхностное натяжение снизилось до 39 мН/м, межфазное натяжение – до 2 мН/м. Для характеристики химической структуры биосурфактантов использовали тонкослойную хроматографию и инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье. По результатам качественной оценки выявлена гликолипидная природа вторичных метаболитов. Критическую концентрацию мицеллообразования определяли по точке перегиба на кривых зависимостях поверхностного натяжения от содержания биосурфактанта. Значение критической концентрации мицеллообразования составило 200 мг/л при постоянном поверхностном натяжении 39 мН/м. Новый штамм Gordonia amicalis G2 продемонстрировал эффективную способность к продукции гликолипидных биосурфактантов. Учитывая способность Gordonia amicalis G2 участвовать в синтезе каротиноидов, можно предположить разработку комплексной технологии получения вторичных метаболитов на основе данного штамма.*

Ключевые слова: *Gordonia, биосурфактанты, каротиноиды, поверхностное натяжение, межфазное натяжение, гликолипиды, критическая концентрация мицеллообразования*

Финансирование. *Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-20033 (https://rscf.ru/project/24-24-20033/) и правительства Тульской области.*

Для цитирования: Нечаева И.А., Осина А.Н., Филиппова А.С., Нам Н.В.Т., Мо Л.Т. Штамм *Gordonia amicalis* G2 – продуцент поверхностно-активных веществ биологического происхождения // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 213–223. DOI: 10.21285/achb.978. EDN: SQKPVO.

© Нечаева И.А., Осина А.Н., Филиппова А.С., Нам Н.В.Т., Мо Л.Т., 2025

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Gordonia amicalis G2 strain as a producer of biosurfactants

Irina A. Nechaeva*✉, Anna N. Osina*, Anastasia S. Filippova*, Nguyen V.T. Nam**, Luong T. Mo**

*Tula State University, Tula, Russian Federation
**Southern Branch of the Joint Russia-Vietnam Tropical Research and Technology Center, Ho Chi Minh City, Vietnam

Abstract. *The present study was aimed at analyzing the ability of a new paraffin-degrading strain, Gordonia amicalis G2, isolated from the contaminated sand of a seaport in Vietnam, to produce biosurfactants. The production of biosurfactants by the Gordonia amicalis G2 strain was monitored during bacterial growth in batch culture with the use of hexadecane as the growth medium. The effectiveness of produced biosurfactants was evaluated in terms of surface and interfacial tension. The surface and interfacial tension of biosurfactant solutions were determined using the du Noüy ring method by means of a Kruss K6 tensiometer. Surface tension decreased to 39 mN/m; interfacial tension, to 2 mN/m. The chemical structure of biosurfactants was characterized using thin-layer chromatography and Fourier transform infrared spectroscopy. A qualitative assessment revealed the glycolipid nature of secondary metabolites. The critical micelle concentration was determined from the inflection point of the curves showing the dependence of surface tension on the biosurfactant content. The critical micelle concentration amounted to 200 mg/L at a constant surface tension of 39 mN/m. The new Gordonia amicalis G2 strain was found to have an effective ability to produce glycolipid biosurfactants. Given the ability of Gordonia amicalis G2 to participate in the synthesis of carotenoids, an integrated technology could be developed for secondary metabolite production by this strain.*

Keywords: *Gordonia, biosurfactants, carotenoids, surface tension, interfacial tension, glycolipids, critical micelle concentration*

Funding. *The Russian Science Foundation (no. 24-24-20033, https://rscf.ru/project/24-24-20033/) and the government of the Tula region supported the research.*

For citation: Nechaeva I.A., Osina A.N., Filippova A.S., Nam N.V.T., Mo L.T. *Gordonia amicalis* G2 strain as a producer of biosurfactants. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2):213-223. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.978. EDN: SQKPVO.

ВВЕДЕНИЕ

Представители рода *Gordonia* являются аэробными грамположительными нокардиоморфными актиномицетами. Различные виды гордоний выделены из почвы [1], морской воды [2], сточных вод [3], территорий фермерских хозяйств, птичников [4], мест нефтяных разливов [5]. Широкий ареал их обитания во многом обеспечивается высокой метаболической активностью, благодаря которой представители *Gordonia* способны утилизировать большой спектр различных соединений, в том числе промышленные загрязнители – алканы [6], ароматические углеводороды (пирен [7], фенантрен [2]), эфиры фталевой кислоты [8], нитрилы [9], некоторые синтетические инсектициды (тетраметрин, D-цифенотрин, хлоремпентрин, праллетрин, аллетрин) [10], бифенилы и их полихлорированные производные [11], фенол [12] пиридины [13], стероидные соединения (холестерол [14], эстрадиол [15]). Отличительной особенностью гордоний является способность осуществлять десульфуризацию сероорганических соединений, например изопренового каучука [16], тиофена [17] или дибензотиофена [18]. Бактерии рода *Gordonia* обладают устойчивостью к действию тяжелых металлов, что важно для их практического применения в экологической биотехнологии. Так, штамм *Gordonia alkanivorans* YC-RL2 проявлял устойчивость к ионам Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} и Pb^{2+} [11].

Кроме того, гордонии синтезируют широкий спектр вторичных метаболитов, которые имеют значительный потенциал для применения в различных отраслях промышленности и областях деятельности человека. К таким соединениям относятся антибиотики (актиномицин D) [19], алкалоиды (пимпринин, кладониамин), фенилпропаноиды (атрамицин типов A и B, куркумин A, B и C, 1,4-дифенил-2,3-бутандиол) [20], сидерофоры (дифероксамин [20, 21]), бендиголы [22], терпеноиды [23], каротиноиды [24], липопептиды [19], экзополисахариды [25], биосурфактанты [26].

Биосурфактанты рассматриваются как «зеленые» аналоги синтетических поверхностно-активных веществ. Они нетоксичны, биоразлагаемы, стабильны в широком диапазоне температур, pH и ионной силы [27]. Показано, что некоторые из них обладают антибактериальной, противовирусной, противогрибковой, противораковой и иммунологической активностью [28–30]. Благодаря вышеперечисленным преимуществам и свойствам биосурфактанты предложено использовать в сельском

хозяйстве [31], косметологии [32], медицине и фармацевтике [33], пищевой промышленности [34] и нефтегазовой отрасли [35].

Несмотря на большой спрос и многочисленные преимущества биосурфактантов, их широкое использование ограничено относительно высокой стоимостью. Для снижения затрат на их производство предложены различные биотехнологические подходы, такие как твердофазная ферментация, оптимизация состава питательной среды, иммобилизация продуцентов [36]. В то же время микроорганизм-продуцент играет ключевую роль в реализации биотехнологического процесса. Учитывая высокий деградативный потенциал и устойчивость к токсикантам, поиск продуцентов поверхностно-активных веществ среди гордоний позволит найти новые штаммы с большим биотехнологическим потенциалом.

В связи с вышесказанным целью проведенной работы являлось оценка потенциала нового штамма *Gordonia amicalis* G2 – деструктора углеводородов нефти для применения в технологии получения «зеленых» поверхностно-активных веществ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования. В исследовании использовали штамм *G. amicalis* G2 из рабочей коллекции лаборатории экологической и медицинской биотехнологии Научно-исследовательского центра «БиоХимТех» Тульского государственного университета (г. Тула, Россия). Этот штамм выделен из загрязненного песка морского порта Кат Лай (г. Хошимин, Вьетнам) и предоставлен для исследований кандидатом химических наук, заведующим лабораторией тропической медицины Южного отделения Совместного Российско-Вьетманского Тропического центра Лыонг Тхи Мо. Геном штамма *G. amicalis* G2 секвенирован и депонирован в базе данных NCBI под номером BioSample SAMN27068010, BioProject PRJNA821361, GenBank CP094665 (хромосома), CP094666 (плазмида pCP89), CP094667 (плазмида pCP113).

Условия культивирования. Периодическое культивирование проводили в колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл модифицированной среды Эванса, с использованием в качестве единственного источника углерода и энергии гексадекан (2% по объему) при 32 °C в течение 96 ч на орбитальном шейкере-инкубаторе ES-20/60 (BioSan, Латвия) при 180 об/мин. Посевная доза инокулята составляла 2%.

Состав среды Лурия – Бертрани, г/л: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 10.

Состав среды Эванса: K_2HPO_4 – 8,71 г; $NaNO_3$ – 1,7 г; 0,1 моль/л раствор Na_2SO_4 – 1 мл; 62 ммоль/л раствор $MgCl_2$ – 1 мл; 1 ммоль/л раствор $CaCl_2$ – 1 мл; 0,005 ммоль/л раствор $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ – 1 мл; раствор микроэлементов – 1 мл. pH среды доводили 1 моль/л раствором HCl до 7,0. Состав раствора микроэлементов в 1%-м водном растворе HCl, г/л: ZnO – 0,41; $FeCl_3$ – 2,9; $MnCl_2$ – 1,28; $CuCl_2$ – 0,13; $CoCl_2$ – 0,26; H_3BO_3 – 0,06.

Питательные среды стерилизовали в течение 30 мин при 121 °C.

Получение бесклеточного супернатанта. Бесклеточный супернатант получали центрифугированием культуральной жидкости на центрифуге Avanti J-30I (Beckman Coulter, США) при 9100 об/мин (10000 *g*) и 4 °C в течение 10 мин.

Определение поверхностного и межфазного натяжения. Поверхностное натяжение бесклеточного супернатанта определяли по методу кольца Дю Нуи с использованием тензиометра K6 (Kruss, Германия) при 25 °C. Раствором сравнения выступала дистиллированная вода (поверхностное натяжение 72 мН/м).

Межфазное натяжение определяли на границе раздела фаз (бесклеточный супернатант – гексадекан). Измерения проводили на тензиометре K6 (Kruss, Германия) при 25°C.

Экстракция биосурфактантов из бесклеточного супернатанта. Экстракцию биосурфактантов проводили в две стадии. На первой стадии бесклеточный супернатант очищали от остатков гексадекана с использованием гексана в соотношении 1:1 (по объему). Очищенный супернатант подкисляли 5 моль/л раствором HCl до pH 3,5 и оставляли при 4 °C на ночь. На второй стадии для извлечения биосурфактантов из подкисленного супернатанта использовали *трет*-метилбутиловый эфир в соотношении 1:1 (по объему). Полученный органический экстракт осушали с использованием безводного $CaCl_2$ в течение 3–5 дней. Растворитель удаляли на ротационном испарителе ИР-1 ЛТ (Labtex, Россия) при 33–35 °C и 0,66–0,68 кгс/см^3. Незадолго до окончания упаривания к смеси добавляли 100 мкл бензола и упаривали досуха.

Определение критической концентрации мицеллообразования. Критическую концентрацию мицеллообразования определяли как точку перегиба на кривых зависимостях поверхностного натяжения от содержания растворов биосурфактантов [37]. Для этого готовили серию растворов с содержанием биосурфактантов от 0 до 500 мг/л и измеряли поверхностное натяжение на тензиометре K6 (Kruss, Германия).

Качественная характеристика биосурфактантов методом тонкослойной хроматографии. Разделение компонентов биосурфактантов проводили на пластинах с силикагелем Sorbfil ПТСХ-АФ-А (ИМИД, Россия) с использованием подвижной фазы хлороформ:метанол:вода (65:15:2 по объему). Для определения наличия углеводов пластины обрабатывали α-нафтолом (0,25 г α-нафтола в 50 мл смеси метанола и воды (1:1 по объему)) и 10%-й серной кислотой и нагревали на плитке при 110 °C до появления интенсивной окраски. Для определения наличия липидов пластины помещали в камеру, насыщенную парами йода, до появления максимальной окраски. Для определения наличия аминокислот тонкослойную хроматографию проводили с использованием подвижной фазы изопропанол:вода (70:30 по объему). Готовые пластины окрашивали раствором нингидрина и нагревали на плитке при 110 °C до появления интенсивной окраски [26].

Исследование структуры биосурфактантов методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье. Инфракрасную (ИК) спектроскопию с преобразованием Фурье экстрактов биосурфактантов проводили на приборе ИнфраЛЮМ ФТ-08 («Люмэкс», Россия) с использованием приставки нарушенного полного внутреннего отражения в диапазоне 4000–400 см$^{-1}$ с разрешением 4 см$^{-1}$.

Статистическая обработка результатов. Эксперименты выполняли в трехкратной повторности. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения MS Excel 2016 и

SigmaPlot 2011. Данные представлены в виде среднего значения с доверительными интервалами. Рассчитаны показатели среднее ± доверительный интервал. Уровень статистической значимости $p \leq 0{,}05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Штамм *G. amicalis* G2 отобран как деструктор парафинов в результате скрининга микроорганизмов, выделенных из загрязненного нефтепродуктами морского песка. В настоящей работе возможность этого штамма использовать гидрофобные источники углерода и энергии оценивали по способности роста на жидких и твердых алканах – додекане ($C_{12}H_{26}$), гексадекане ($C_{16}H_{34}$), нонадекане ($C_{19}H_{40}$) и тетракозане ($C_{24}H_{50}$) и ароматических соединениях – феноле (C_6H_6OH), нафталине ($C_{10}H_8$) и фенантрене ($C_{14}H_{10}$) (рис. 1).

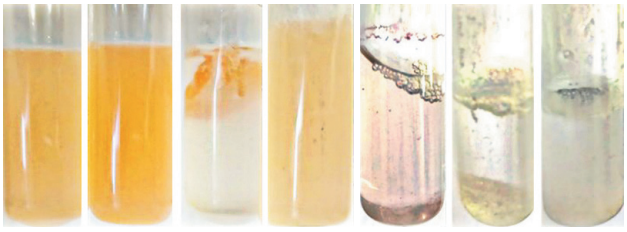


Рис. 1. Рост штамма *Gordonia amicalis* G2 на минеральной среде Эванса, содержащей 1% додекана (a), гексадекана (b), нонадекана (c), тетракозана (d), фенола (e), нафталина (f), фенантрена (g)

Fig. 1. Growth of *Gordonia amicalis* G2 strain on Evans mineral medium containing 1% dodecane (a), hexadecane (b), nonadecane (c), tetracosane (d), phenol (e), naphthalene (f), phenanthrene (g)

Рост бактериальной культуры (образование биомассы оранжевого цвета) наблюдали только на алканах – додекане, гексадекане, нонадекане, тетракозане (см. рис. 1, *a–d*). Следует отметить, что оранжевый цвет биомассы бактерий свидетельствует об образовании каротиноидов, что можно использовать при разработке комплексной технологии получения вторичных метаболитов. Распределение биомассы в объеме культуральной жидкости зависит от агрегатного состояния субстрата. При использовании жидких алканов рост бактериальной культуры происходит во всем объеме культуральной жидкости (см. рис. 1, *a*, *b*). В случае использования твердых алканов в качестве источника углерода и энергии наблюдается адгезия клеток к поверхности субстрата (см. рис. 1, *c*).

Биодеградация алканов является общей чертой для представителей данного рода [38–40]. Кроме того, при росте на углеводородах актиномицеты родов *Rhodococcus*, *Gordonia* продуцируют поверхностно-активные соединения, такие как биоэмульгаторы и биосурфактанты [41]. Мониторинг продукции биосурфактантов штаммом *G. amicalis* G2 проводили в процессе роста бактерий при периодическом культивировании с использованием гексадекана в качестве ростового субстрата. На кривой роста *G. amicalis* G2 начало стационарной фазы соответствует 100 ч культивирования (рис. 2). В этой фазе роста происходит продукция биосурфактантов, что является характерным для вторичных метаболитов.

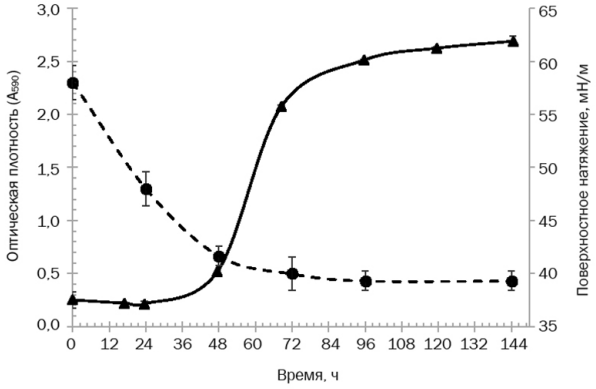


Рис. 2. Кривая роста бактерий *Gordonia amicalis* G2 в условиях периодического культивирования (сплошная линия) и зависимость поверхностного натяжения бесклеточного супернатанта от времени (пунктирная линия)

Fig. 2. Growth curve of *Gordonia amicalis* G2 bacteria under conditions of batch cultivation (solid line) and time dependence of the surface tension of the cell-free supernatant (dotted line)

В стационарной фазе роста поверхностное натяжение снижается до 39 мН/м (см. рис. 2), что свидетельствует об эффективной продукции биосурфактантов на этой стадии. Полученное значение поверхностного натяжения бесклеточного супернатанта соответствует результатам других исследований (30–40 мН/м) [42–45].

Эффективность действия продуцируемых биосурфактанов можно оценить с помощью еще одного показателя – межфазного натяжения на границе раздела фаз между бесклеточным супернатантом и гидрофобным веществом. Межфазное натяжение бесклеточного супернатанта на границе с гексадеканом снизилось с 21 мН/м в начале культивирования микроорганизмов до 2 мН/м в стационарной фазе роста, что указывает на высокую эффективность продукции поверхностно-активных веществ.

Для характеристики биосурфактантов, продуцируемых штаммом *G. amicalis* G2, проводили их выделение методом жидкостной экстракции органическими растворителями. Для этого в работе использовали однокомпонентную систему – метил-*трет*-бутиловый эфир. Этот растворитель менее токсичен и легче поддается биологическому разложению по сравнению с другими системами экстракции (хлороформ:метанол, этилацетат). Кроме того, применение метил-*трет*-бутилового эфира способствует извлечению биосурфактантов из супернатанта с высоким выходом продукта [46].

Метод тонкослойной хроматографии применили для качественной характеристики экстракта биосурфактантов. В парах йода удалось обнаружить несколько компонентов липидов с разной подвижностью (см. рис. 2, *b*). С помощью специфического проявителя на сахара α-нафтольного реагента обнаружили, что эти компоненты имеют гликолипидную природу (рис. 3, *a*). Нингидриновый тест на наличие пептидов и аминокислот дал отрицательный результат (рис. 3, *c*).

Известно, что актиномицеты, к которым относятся гордонии, при росте на гидрофобных субстратах продуцируют биосурфактанты гликолипидной природы [42, 43, 45, 47–49], липогликан [50] и липогликопротеин [51].

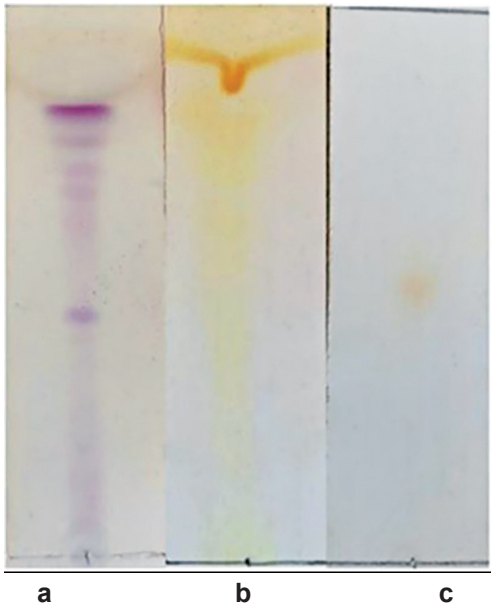


Рис. 3. Хроматограммы биосурфактанта *Gordonia amicalis* G2 при окрашивании α-нафтолом (a), йодом (b) и нингидрином (c)

Fig. 3. Chromatograms of *Gordonia amicalis* G2 biosurfactant staining with α-naphthol (a), iodine (b) and ninhydrin (c)

Тем не менее в большинстве работ показано присутствие именно гликолипидов различного строения.

Для выявления специфических функциональных групп у биосурфактантов *G. amicalis* G2 использовали ИК-спектроскопию с преобразованием Фурье (рис. 4).

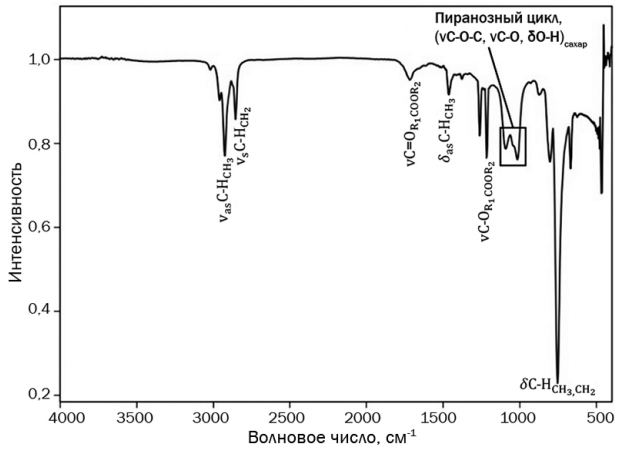


Рис. 4. Инфракрасный спектр биосурфактантов *Gordonia amicalis* G2

Fig. 4. Infrared spectrum of biosurfactans *Gordonia amicalis* G2

В ИК-спектре выявлены характеристические полосы, соответствующие колебаниям пиранозного цикла (1095, 1014 см$^{-1}$), что свидетельствует о наличии остатков сахара в составе биосурфактантов. Кроме того, на спектрах присутствуют полосы поглощения, отвечающие за колебания связи C=O (1714 см$^{-1}$) и C-O (1215 см$^{-1}$) в сложных эфирах, валентные (2922, 2855 см$^{-1}$) и деформационные (1462, 753 см$^{-1}$) колебания связи C-H в алкильных группах жирных кислот. На основании данных ИК-спектров можно заключить, что в составе биосурфактантов содержатся остатки сахаров и жирных кислот. Ранее нашим научным коллективом было показано, что актиномицеты рода *Rhodococcus* продуцируют трегалолипиды, содержащие остатки октановой и декановой кислот. Смесь биосурфактантов представляла собой 2,3,4-сукцинил-октаноил-деканоил-2'-деканоилтрегалозу и 2,3,4-сукцинил-диоктаноил-2'-деканоилтрегалозу [37]. Вероятно, соединения подобного строения могут синтезировать и гордонии.

Важной характеристикой биосурфактантов является значение критической концентрации мицеллообразования. Данный показатель продуцируемых *G. amicalis* G2 биосурфактантов определяли по точке перегиба графической зависимости поверхностного натяжения от содержания биосурфактанта. Значение критической концентрации мицеллообразования составляет 200 мг/л при постоянном поверхностном натяжении 39 мН/м (рис. 5). В работах [7, 26, 52] для биосурфактантов бактерий рода *Gordonia* значения критической концентрации мицеллообразования находится в диапазоне от 90 до 240 мг/л, что соответствует полученным нами данным. Таким образом, новый штамм *G. amicalis* G2, выделенный из загрязненного песка морского порта Вьетнама, продемонстрировал способность к эффективной продукции поверхностно-активных веществ биологического происхождения.

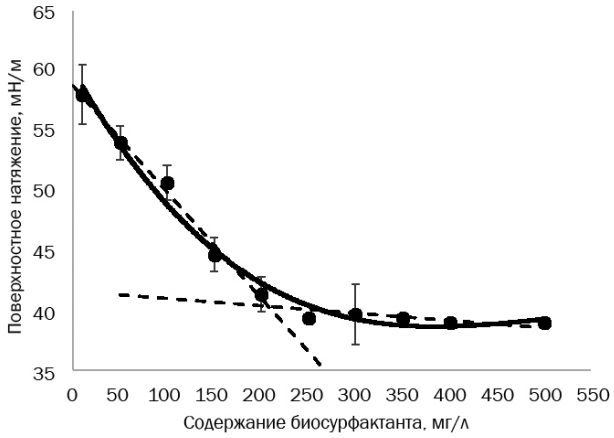


Рис. 5. Зависимость поверхностного натяжения от концентрации биосурфактанта *Gordonia amicalis* G2

Fig. 5. Surface tension versus concentration of biosurfactant *Gordonia amicalis* G2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новый штамм *G. amicalis* G2 способен к использованию в качестве единственного источника углерода и энергии алканов как в жидком, так и в твердом агрегатном состоянии. При периодическом культивировании с использованием гексадекана в качестве ростового субстрата в стационарной фазе роста происходила продукция биосурфактантов. Эффективность действия продуцируемых биосурфактанов оценили с помощью поверхностного и межфазного натяжения. Поверхностное натяжение снижалось до 39 мН/м, межфазное натяжение – до 2 мН/м. Специфические

функциональные группы у биосурфактантов *G. amicalis* G2 выявлены с использованием ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье. В ИК-спектре присутствуют характеристические полосы, соответствующие колебаниям пиранозного цикла, что свидетельствует о наличии остатков сахара в составе биосурфактантов. Кроме того, выявлены полосы поглощения, отвечающие за колебания связей C=O и C-O в сложных эфирах, валентные и деформационные колебания связи C-H в алкильных группах жирных кислот. Таким образом, в составе биосурфактантов содержатся остатки сахаров и жирных кислот. Для характеристики биосурфактантов определяли критическую концентрацию мицеллообразования по точке перегиба на кривых зависимостях поверхностного натяжения от содержания биосурфактанта. Значение данного показателя составило 200 мг/л при постоянном поверхностном натяжении 39 мН/м. Выделенные биосурфактанты гликолипидной природы будут использованы при изучении их солюбилизирующей способности в отношении гидрофобных соединений.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kim Y.S., Roh S.G., Kim S.B. *Gordonia insulae* sp. nov., isolated from an island soil // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2020. Vol. 70, no. 3. P. 2079–2083. DOI: 10.1099/ijsem.0.004023.

2. Mai Z., Wang L., Li Q., Sun Y., Zhang S. Biodegradation and metabolic pathway of phenanthrene by a newly isolated bacterium *Gordonia* sp. SCSI019801 // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2021. Vol. 585. P. 42–47. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.10.069.

3. Riesco R., Rose J.J.A., Batinovic S., Petrovski S., Sánchez-Juanes F., Seviour R.J., et al. *Gordonia pseudamarae* sp. nov., a home for novel actinobacteria isolated from stable foams on activated sludge wastewater treatment plants // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2022. Vol. 72, no. 10. P. 005547. DOI: 10.1099/ijsem.0.005547.

4. Sowani H., Kulkarni M., Zinjarde S. An insight into the ecology, diversity and adaptations of *Gordonia* species // Critical Reviews in Microbiology. 2018. Vol. 44, no. 4. P. 393–413. DOI: 10.1080/1040841X.2017.1418286.

5. Kim H.-S., Dong K., Kim J., Lee S.-S. Characteristics of crude oil-degrading bacteria *Gordonia iterans* isolated from marine coastal in Taean sediment // MicrobiologyOpen. 2019. Vol. 8, no. 6. P. e00754. DOI: 10.1002/mbo3.754.

6. Silva N.M., de Oliveira A.M.S.A., Pegorin S., Giusti C.E., Ferrari V.B., Barbosa D., et al. Characterization of novel hydrocarbon-degrading *Gordonia paraffinivorans* and *Gordonia sihwensis* strains isolated from composting // PLOS One. 2019. Vol. 14, no. 4. P. e0215396. DOI: 10.1371/journal.pone.0215396.

7. Kurniati T.H., Rusmana I., Suryani A., Mubarik N.R. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by biosurfactant-producing bacteria *Gordonia cholesterolivorans* AMP 10 // Biosaintifika: Journal of Biology and Biology Education. 2016. Vol. 8, no. 3. P. 336–343. DOI: 10.15294/biosaintifika.v8i3.6448.

8. Zhang H., Lin Z., Liu B., Wang G., Weng L., Zhou J., et al. Bioremediation of di-(2-ethylhexyl) phthalate contaminated red soil by *Gordonia terrae* RL-JC02: characterization, metabolic pathway and kinetics // Science of the Total Environment. 2020. Vol. 733. P. 139138. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139138.

9. Kumar V., Bhalla T.C. Transformation of *p*-hydroxybenzonitrile to *p*-hydroxybenzoic acid using nitrilase activity of *Gordonia terrae* // Biocatalysis and Biotransformation. 2013. Vol. 31, no. 1. P. 42–48. DOI: 10.3109/10242422.2012.757761.

10. Guo Y., Huang Y., Pang S., Zhou T., Lin Z., Yu H., et al. Novel mechanism and kinetics of tetramethrin degradation using an indigenous *Gordonia cholesterolivorans* A16 // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22, no. 17. P. 9242. DOI: 10.3390/ijms22179242.

11. Nahurira R., Wang J., Yan Y., Jia Y., Fan S., Khokhar I., et al. In silico genome analysis reveals the metabolic versatility and biotechnology potential of a halotorelant phthalic acid esters degrading *Gordonia alkanivorans* strain YC-RL_2 // AMB Express. 2019. Vol. 9. P. 1–13. DOI: 10.1186/s13568-019-0733-5.

12. Kim K.K., Lee K.C., Klenk H.-P., Oh H.-M., Lee J.-S. *Gordonia kroppenstedtii* sp. nov., a phenol-degrading actinomycete isolated from a polluted stream // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2009. Vol. 59, no. 8. P. 1992–1996. DOI: 10.1099/ijs.0.005322-0.

13. Stobdan T., Sinha A., Singh R.P., Adhikari D.K. Degradation of pyridine and 4-methylpyridine by *Gordonia terrea* IIPN1 // Biodegradation. 2008. Vol. 19. P. 481–487. DOI: 10.1007/s10532-007-9152-4.

14. Drzyzga O., de las Heras L.F., Morales V., Navarro Llorens J.M., Perera J. Cholesterol degradation by *Gordonia cholesterolivorans* // Applied and Environmental Microbiology. 2011. Vol. 77, no. 14. P. 4802–4810. DOI: 10.1128/AEM.05149-11.

15. Liu N., Maser E., Zhang T. Genomic analysis of *Gordonia polyisoprenivorans* strain R9, a highly effective 17 beta-estradiol-and steroid-degrading bacterium // Chemico-Biological Interactions. 2021. Vol. 350. P. 109685. DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109685.

16. Arenskötter M., Baumeister D., Berekaa M.M., Pötter G., Kroppenstedt R.M., Linos A., et al. Taxonomic characterization of two rubber degrading bacteria belonging to the species *Gordonia polyisoprenivorans* and analysis of hyper variable regions of 16S rDNA sequences // FEMS Microbiology Letters. 2001. Vol. 205, no. 2. P. 277–282. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10961.x.

17. Delegan Y., Kocharovskaya Y., Frantsuzova E., Streletskii R., Vetrova A. Characterization and genomic analysis of *Gordonia alkanivorans* 135, a promising dibenzothiophene-degrading strain // Biotechnology Reports. 2021. Vol. 29. P. e00591. DOI: 10.1016/j.btre.2021.e00591.

18. Ahmad V., Ahmad A., Khan M.I., Baothman O.A.S., Khan M.J. Desulfurization of benzothiophene by an isolated *Gordonia* sp. IITR100 // Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2021. Vol. 10, no. 5. P. e2787. DOI: 10.15414/jmbfs.2787.

19. Ma Y., Xu M., Liu H., Yu T., Guo P., Liu W., et al. Antimicrobial compounds were isolated from the secondary metabolites of *Gordonia*, a resident of intestinal tract of *Periplaneta americana* // AMB Express. 2021. Vol. 11. P. 1–11. DOI: 10.1186/s13568-021-01272-y.

20. Sánchez-Suárez J., Diaz L., Coy-Barrera E. Villamil L. Specialized metabolism of Gordonia genus: an integrated survey on chemodiversity combined with a comparative genomics-based analysis // BioTech. 2022. Vol. 11, no. 4.

P. 53. DOI: 10.3390/biotech11040053.

21. Schwabe R., Senges C.H.R., Bandow J.E., Heine T., Lehmann H., Wiche O., et al. Cultivation dependent formation of siderophores by *Gordonia rubripertincta* CWB2 // Microbiological Research. 2020. Vol. 238. P. 126481. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126481.

22. Schneider K., Graf E., Irran E., Nicholson G., Stainsby F.M., Goodfellow M., et al. Bendigoles A~C, new steroids from *Gordonia australis* Acta 2299 // The Journal of Antibiotics. 2008. Vol. 61, no. 6. P. 356–364. DOI: 10.1038/ja.2008.50.

23. Wang J., He M., Zeng H., Liu W., Luo X., Ma Y., et al. A cytotoxic triterpenoid from a *Periplaneta americana*-derived, *Gordonia hongkongensis* WA12-1-1 // FEMS Microbiology Letters. 2022. Vol. 369, no. 1. P. fnac121. DOI: 10.1093/femsle/fnac121.

24. Loh W.L.C., Huang K.-C., Ng H.S., Lan J.C.-W. Exploring the fermentation characteristics of a newly isolated marine bacteria strain, *Gordonia terrae* TWRH01 for carotenoids production // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2020. Vol. 130, no. 2. P. 187–194. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2020.03.007.

25. Liu W., Xing X., Dong Q., Liu X., Li W. Isolation and identification of the alga-symbiotic bacterium Gordonia and characterization of its exopolysaccharide // Natural Product Research. 2024. Vol. 38, no. 3. P. 523–529. DOI: 10.1080/14786419.2022.2123477.

26. Zargar A.N., Mishra S., Kumar M., Srivastava P. Isolation and chemical characterization of the biosurfactant produced by *Gordonia* sp. IITR100 // PLOS One. 2022. Vol. 17, no. 4. P. e0264202. DOI: 10.1371/journal.pone.0264202.

27. Абащева М.А., Хоравиди Е.Х., Акатова Е.В., Нечаева И.А., Бабкина Е.Е., Понаморева О.Н. Влияние физико-химических факторов окружающей среды на поверхностные свойства продуцируемых штаммом *Rhodococcus erythropolis* X5 биосурфактантов // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. 2023. N 4. С. 28–37. DOI: 10.24412/2071-6176-2023-4-28-37. EDN: AFLLDA.

28. Soberón-Chávez G., Maier R.M. Biosurfactants: a general overview // Biosurfactants: from genes to applications / ed. G. Soberón-Chávez. Berlin: Springer-Verlag, 2011. P. 1–11. DOI: 10.1007/978-3-642-14490-5_1.

29. Пат. № 2673747, Российская Федерация, МПК C12N 1/20, C09K 8/582 , C12R 1/01. Штамм *Gordonia amicalis*, способный к генерации непосредственно в нефтяном пласте нефтевытесняющего агента – биоПАВ и снижающий содержание сероорганических соединений нефти / И.А. Борзенков, Д.Ш. Соколова, Т.Н. Назина, Т.Л. Бабич, Е.М. Семенова, А.П. Ершов [и др.]. Заявл. 29.11.2018; опубл. 29.11.2018. Бюл. № 34.

30. Hao D.-H. Lin J.-Q., Song X., Lin. J.-Q., Su Y.-J., Qu Y.-B. Isolation, identification, and performance studies of a novel paraffin-degrading bacterium of *Gordonia amicalis* LH3 // Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2008. Vol. 13, no. 1. P. 61–68. DOI: 10.1007/s12257-007-0168-8.

31. Datta D., Ghosh S., Kumar S., Gangola S., Majumdar B., Saha R., Mazumdar S.P., et al. Microbial biosurfactants: multifarious applications in sustainable agriculture // Microbiological Research. 2024. Vol. 279. P. 127551. DOI: 10.1016/j.micres.2023.127551.

32. Karnwal A., Shrivastava S., Al-Tawaha A.R.M.S., Kumar G., Singh R., Kumar A., et al. Microbial biosurfactant as an alternate to chemical surfactants for application in cosmetics industries in personal and skin care products: a critical review // BioMed Research International. 2023. P. 2375223. DOI: 10.1155/2023/2375223.

33. Ceresa C., Fracchia L., Sansotera A.C., de Rienzo M.A.D., Banat I.M. Harnessing the potential of biosurfactants for biomedical and pharmaceutical applications // Pharmaceutics. 2023. Vol. 15, no. 8. P. 2156. DOI: 10.3390/pharmaceutics15082156.

34. Roy A., Khan M.R., Mukherjee A.K. Recent advances in the application of microbial biosurfactants in food industries: opportunities and challenges // Food Control. 2024. Vol. 163. P. 110465. DOI: 10.1016/j.foodcont.2024.110465.

35. Shaikhah D., Loise V., Angelico R., Porto M., Calandra P., Abe A.A., et al. New trends in biosurfactants: from renewable origin to green enhanced oil recovery applications // Molecules. 2024. Vol. 29, no. 2. P. 301. DOI: 10.3390/molecules29020301.

36. Miao Y., To M.H., Siddiqui M.A., Wang H., Lodens S., Chopra S.S., et al. Sustainable biosurfactant production from secondary feedstock – recent advances, process optimization and perspectives // Frontiers in Chemistry. 2024. Vol. 12. P. 1327113. DOI: 10.3389/fchem.2024.1327113.

37. Лыонг Т.М., Нечаева И.А, Петриков К.В., Филонов А.Е., Понаморева О.Н. Структура и физико-химические свойства гликолипидных биосурфактантов, продуцируемых бактериями-нефтедеструкторами *Rhodococcus* sp. X5 // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7. N 2. С. 72–79. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-2-72-79. EDN: YTPLSH.

38. Ehiosun K.I., Godin S., Urios L., Lobinski R., Grimaud R. Degradation of long-chain alkanes through biofilm formation by bacteria isolated from oil-polluted soil // International Biodeterioration & Biodegradation. 2022. Vol. 175. P. 105508. DOI: 10.1016/j.ibiod.2022.105508.

39. Ivanova A.E., Borzenkov I.A., Sokolova D.Sh. Catabolic potential and surfactant activity of halotolerant hydrocarbon-oxidizing bacteria // Microbiology. 2021. Vol. 90. P. 405–415. DOI: 10.1134/S0026261721040056.

40. Liu Y., Wu J., Liu Y., Wu X. Biological process of alkane degradation by *Gordonia sihwaniensis* // ACS Omega. 2021. Vol. 7, no. 1. P. 55–63. DOI: 10.1021/acsomega.1c01708.

41. Stainsby F.M., Hodar J., Vaughan H. Biosurfactant production by mycolic acid-containing Actinobacteria // Actinobacteria – diversity, applications and medical aspects / ed. W.N. Hozzein. 2022. P. 1835–2131. DOI: 10.5772/intechopen.104576.

42. Kumar R., Das A.J. Extraction, detection, and characterization of rhamnolipid biosurfactants from microorganisms // Rhamnolipid biosurfactant: recent trends in production and application / eds R. Kumar, A.J. Das. Singapore: Springer, 2018. P. 15–28. DOI: 10.1007/978-981-13-1289-2_2.

43. Pardhi D.S., Panchal R.R., Raval V.H., Joshi R.G., Poczai P., Almalki W.H., et al. Microbial surfactants: a journey from fundamentals to recent advances // Frontiers in Microbiology. 2022. Vol. 13. P. 982603. DOI: 10.3389/fmicb.2022.982603.

44. Elshikh M., Moya-Ramírez I., Moens H., Roelants S., Soetaert W., Marchant R., et al. Rhamnolipids and lactonicsophorolipids: natural antimicrobial surfactants for oral hygiene // Journal of Applied Microbiology. 2017.

Vol. 123, no. 5. P. 1111–1123. DOI: 10.1111/jam.13550.

45. Sowani H., Deshpande A., Gupta V., Kulkarni M., Zinjarde S. Biodegradation of squalene and n-hexadecane by *Gordonia amicalis* HS-11 with concomitant formation of biosurfactant and carotenoid // International Biodeterioration & Biodegradation. 2019. Vol. 142. P. 172–181. DOI: 10.1016/j.ibiod.2019.05.005.

46. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Philp J.C., Christofi N., Dunban S.A., Ritchkova M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction // Journal of Microbiological Methods. 2001. Vol. 46, no. 2. P. 149–156. DOI: 10.1016/S0167-7012(01)00259-7.

47. Laorrattanasak S., Rongsayamanont W., Khondee N., Paorach N., Soonglerdsongpha S., Pinyakong O., et al. Production and application of *Gordonia westfalica* GY40 biosurfactant for remediation of fuel oil spill // Water, Air, and Soil Pollution. 2016. Vol. 227, no. 9. P. 325. DOI: 10.1007/s11270-016-3031-8.

48. Delegan Y., Sargsyan A., Hovhannisyan N., Babayan B., Petrikov K., Vainstein M. Analysis of genome sequence and trehalose lipid production peculiarities of the thermotoerant *Gordonia* strain // Journal of Basic Microbiology. 2020. Vol. 60, no. 1. P. 14–21. DOI: 10.1002/jobm.201900439.

49. Janek T., Rodrigues L.R., Gudiña E.J., Czyżnikowska Z. Structure and mode of action of cyclic lipopeptide pseudofactin II with divalent metal ions // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2016. Vol. 146. P. 498–506. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.06.055.

50. Garton N.J., Sutcliffe I.C. Identification of a lipoarabinomannan-like lipoglycan in the actinomycete *Gordonia bronchialis* // Archives of Microbiology. 2006. Vol. 184, no. 6. P. 425–427. DOI: 10.1007/s00203-005-0050-z.

51. Silva T.P., Paixão S.M., Tavares J., Gil C.V., Torres C.A.V., Freitas F., et al. A new biosurfactant/bioemulsifier from *Gordonia alkanivorans* strain 1B: production and characterization // Processes. 2022. Vol. 10, no. 5. P. 845. DOI: 10.3390/pr10050845.

52. Franzetti A., Caredda P., La Colla P., Pintus M., Tamburini E., Papacchini M., et al. Cultural factors affecting biosurfactant production by *Gordonia* sp. BS29 // International Biodeterioration & Biodegradation. 2009. Vol. 63, no. 7. P. 943–947. DOI: 10.1016/j.ibiod.2009.06.001.

REFERENCES

1. Kim Y.S., Roh S.G., Kim S.B. *Gordonia insulae* sp. nov., isolated from an island soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020;70(3):2079-2083. DOI: 10.1099/ijsem.0.004023.

2. Mai Z., Wang L., Li Q., Sun Y., Zhang S. Biodegradation and metabolic pathway of phenanthrene by a newly isolated bacterium *Gordonia* sp. SCSIO19801. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2021;585:42-47. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.10.069.

3. Riesco R., Rose J.J.A., Batinovic S., Petrovski S., Sánchez-Juanes F., Seviour R.J., et al. *Gordonia pseudamarae* sp. nov., a home for novel actinobacteria isolated from stable foams on activated sludge wastewater treatment plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2022;72(10):005547. DOI: 10.1099/ijsem.0.005547.

4. Sowani H., Kulkarni M., Zinjarde S. An insight into the ecology, diversity and adaptations of *Gordonia* species. *Critical Reviews in Microbiology*. 2018;44(4):393-413. DOI: 10.1080/1040841X.2017.1418286.

5. Kim H.-S., Dong K., Kim J., Lee S.-S. Characteristics of crude oil-degrading bacteria *Gordonia iterans* isolated from marine coastal in Taean sediment. *MicrobiologyOpen*. 2019;8(6):e00754. DOI: 10.1002/mbo3.754.

6. Silva N.M., de Oliveira A.M.S.A., Pegorin S., Giusti C.E., Ferrari V.B., Barbosa D., et al. Characterization of novel hydrocarbon-degrading *Gordonia paraffinivorans* and *Gordonia sihwensis* strains isolated from composting. *PLOS One*. 2019;14(4):e0215396. DOI: 10.1371/journal.pone.0215396.

7. Kurniati T.H., Rusmana I., Suryani A., Mubarik N.R. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by biosurfactant-producing bacteria *Gordonia cholesterolivorans* AMP 10. *Biosaintifika: Journal of Biology and Biology Education*. 2016;8(3):336-343. DOI: 10.15294/biosaintifika.v8i3.6448.

8. Zhang H., Lin Z., Liu B., Wang G., Weng L., Zhou J., et al. Bioremediation of di-(2-ethylhexyl) phthalate contaminated red soil by *Gordonia terrae* RL-JC02: characterization, metabolic pathway and kinetics. *Science of the Total Environment*. 2020;733:139138. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139138.

9. Kumar V., Bhalla T.C. Transformation of *p*-hydroxybenzonitrile to *p*-hydroxybenzoic acid using nitrilase activity of *Gordonia terrae*. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2013;31(1):42-48. DOI: 10.3109/10242422.2012.757761.

10. Guo Y., Huang Y., Pang S., Zhou T., Lin Z., Yu H., et al. Novel mechanism and kinetics of tetramethrin degradation using an indigenous *Gordonia cholesterolivorans* A16. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(17):9242. DOI: 10.3390/ijms22179242.

11. Nahurira R., Wang J., Yan Y., Jia Y., Fan S., Khokhar I., et al. In silico genome analysis reveals the metabolic versatility and biotechnology potential of a halotorelant phthalic acid esters degrading *Gordonia alkanivorans* strain YC-RL$_2$. *AMB Express*. 2019;9:1-13. DOI: 10.1186/s13568-019-0733-5.

12. Kim K.K., Lee K.C., Klenk H.-P., Oh H.-M., Lee J.-S. *Gordonia kroppenstedtii* sp. nov., a phenol-degrading actinomycete isolated from a polluted stream. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009;59(8):1992-1996. DOI: 10.1099/ijs.0.005322-0.

13. Stobdan T., Sinha A., Singh R.P., Adhikari D.K. Degradation of pyridine and 4-methylpyridine by *Gordonia terrea* IIPN1. *Biodegradation*. 2008;19:481-487. DOI: 10.1007/s10532-007-9152-4.

14. Drzyzga O., de las Heras L.F., Morales V., Navarro Llorens J.M., Perera J. Cholesterol degradation by *Gordonia cholesterolivorans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(14):4802-4810. DOI: 10.1128/AEM.05149-11.

15. Liu N., Maser E., Zhang T. Genomic analysis of *Gordonia polyisoprenivorans* strain R9, a highly effective 17 beta-estradiol-and steroid-degrading bacterium. *Chemico-Biological Interactions*. 2021;350:109685. DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109685.

16. Arenskötter M., Baumeister D., Berekaa M.M., Pötter G., Kroppenstedt R.M., Linos A., et al. Taxonomic

characterization of two rubber degrading bacteria belonging to the species *Gordonia polyisoprenivorans* and analysis of hyper variable regions of 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiology Letters*. 2001;205(2):277-282. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10961.x.

17. Delegan Y., Kocharovskaya Y., Frantsuzova E., Streletskii R., Vetrova A. Characterization and genomic analysis of *Gordonia alkanivorans* 135, a promising dibenzothiophene-degrading strain. *Biotechnology Reports*. 2021;29:e00591. DOI: 10.1016/j.btre.2021.e00591.

18. Ahmad V., Ahmad A., Khan M.I., Baothman O.A.S., Khan M.J. Desulfurization of benzothiophene by an isolated *Gordonia* sp. IITR100. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2021;10(5):e2787. DOI: 10.15414/jmbfs.2787.

19. Ma Y., Xu M., Liu H., Yu T., Guo P., Liu W., et al. Antimicrobial compounds were isolated from the secondary metabolites of *Gordonia*, a resident of intestinal tract of *Periplaneta Americana. AMB Express*. 2021;11:1-11. DOI: 10.1186/s13568-021-01272-y.

20. Sánchez-Suárez J., Diaz L., Coy-Barrera E. Villamil L. Specialized metabolism of Gordonia genus: an integrated survey on chemodiversity combined with a comparative genomics-based analysis. *BioTech*. 2022;11(4):53. DOI: 10.3390/biotech11040053.

21. Schwabe R., Senges C.H.R., Bandow J.E., Heine T., Lehmann H., Wiche O., et al. Cultivation dependent formation of siderophores by *Gordonia rubripertincta* CWB2. *Microbiological Research*. 2020;238:126481. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126481.

22. Schneider K., Graf E., Irran E., Nicholson G., Stainsby F.M., Goodfellow M., et al. Bendigoles A~C, new steroids from *Gordonia australis* Acta 2299. *The Journal of Antibiotics*. 2008;61(6):356-364. DOI: 10.1038/ja.2008.50.

23. Wang J., He M., Zeng H., Liu W., Luo X., Ma Y., et al. A cytotoxic triterpenoid from a *Periplaneta americana*-derived, *Gordonia hongkongensis* WA12-1-1. *FEMS Microbiology Letters*. 2022;369(1):fnac121. DOI: 10.1093/femsle/fnac121.

24. Loh W.L.C., Huang K.-C., Ng H.S., Lan J.C.-W. Exploring the fermentation characteristics of a newly isolated marine bacteria strain, *Gordonia terrae* TWRH01 for carotenoids production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2020;130(2):187-194. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2020.03.007.

25. Liu W., Xing X., Dong Q., Liu X., Li W. Isolation and identification of the alga-symbiotic bacterium Gordonia and characterization of its exopolysaccharide. *Natural Product Research*. 2024;38(3):523-529. DOI: 10.1080/14786419.2022.2123477.

26. Zargar A.N., Mishra S., Kumar M., Srivastava P. Isolation and chemical characterization of the biosurfactant produced by *Gordonia* sp. IITR100. *PLOS One*. 2022;17(4):e0264202. DOI: 10.1371/journal.pone.0264202.

27. Abashcheva M.A., Horavidi E.X., Akatova E.V., Nechaeva I.A., Babkina E.E., Ponamoreva O.N. Influence of physico-chemical environmental factors on the surface properties of biosurfactant produced by the strain *Rhodococcus erythropolis* X5. *Izvestiya Tula State University*. 2023;4:28-37 (In Russian). DOI: 10.24412/2071-6176-2023-4-28-37. EDN: AFLLDA.

28. Soberón-Chávez G., Maier R.M. Biosurfactants: a general overview. In: Soberón-Chávez G. (ed.). *Biosurfactants: from genes to applications*. Berlin: Springer-Verlag; 2011, p. 1-11. DOI: 10.1007/978-3-642-14490-5_1.

29. Borzenkov I.A., Sokolova D.Sh., Nazina T.N., Babich T.L., Semenova E.M., Ershov A.P., et al. *Gordonia amicalis strain with ability of generation directly in oil reservoir of oil-displacing agent - bioPAV and decreasing content of organosulfur compounds of oil.* Patent RF, no. 2673747; 2018.

30. Hao D.-H. Lin J.-Q., Song X., Lin. J.-Q., Su Y.-J., Qu Y.-B. Isolation, identification, and performance studies of a novel paraffin-degrading bacterium of *Gordonia amicalis* LH3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2008;13(1):61-68. DOI: 10.1007/s12257-007-0168-8.

31. Datta D., Ghosh S., Kumar S., Gangola S., Majumdar B., Saha R., Mazumdar S.P., et al. Microbial biosurfactants: multifarious applications in sustainable agriculture. *Microbiological Research*. 2024;279:127551. DOI: 10.1016/j.micres.2023.127551.

32. Karnwal A., Shrivastava S., Al-Tawaha A.R.M.S., Kumar G., Singh R., Kumar A., et al. Microbial biosurfactant as an alternate to chemical surfactants for application in cosmetics industries in personal and skin care products: a critical review. *BioMed Research International*. 2023:2375223. DOI: 10.1155/2023/2375223.

33. Ceresa C., Fracchia L., Sansotera A.C., de Rienzo M.A.D., Banat I.M. Harnessing the potential of biosurfactants for biomedical and pharmaceutical applications. *Pharmaceutics*. 2023;15(8):2156. DOI: 10.3390/pharmaceutics15082156.

34. Roy A., Khan M.R., Mukherjee A.K. Recent advances in the application of microbial biosurfactants in food industries: opportunities and challenges. *Food Control*. 2024;163:110465. DOI: 10.1016/j.foodcont.2024.110465.

35. Shaikhah D., Loise V., Angelico R., Porto M., Calandra P., Abe A.A., et al. New trends in biosurfactants: from renewable origin to green enhanced oil recovery applications. *Molecules*. 2024;29(2):301. DOI: 10.3390/molecules29020301.

36. Miao Y., To M.H., Siddiqui M.A., Wang H., Lodens S., Chopra S.S., et al. Sustainable biosurfactant production from secondary feedstock – recent advances, process optimization and perspectives. *Frontiers in Chemistry*. 2024;12:1327113. DOI: 10.3389/fchem.2024.1327113.

37. Luong T.M., Nechaeva I.A, Petrikov K.V., Filonov A.E., Ponamoreva O.N. Structure and physicochemical properties of glycolipid biosurfactants, produced by oil-degrading bacteria *Rhodococcus* sp. X5. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2017;7(2):72-79. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-2-72-79. EDN: YTPLSH.

38. Ehiosun K.I., Godin S., Urios L., Lobinski R., Grimaud R. Degradation of long-chain alkanes through biofilm formation by bacteria isolated from oil-polluted soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2022;175:105508. DOI: 10.1016/j.ibiod.2022.105508.

39. Ivanova A.E., Borzenkov I.A., Sokolova D.Sh. Catabolic potential and surfactant activity of halotolerant hydrocarbon-oxidizing bacteria. *Microbiology*. 2021;90:405-415. DOI: 10.1134/S0026261721040056.

40. Liu Y., Wu J., Liu Y., Wu X. Biological process of alkane degradation by *Gordonia sihwaniensis*. *ACS Omega*. 2021;7(1):55-63. DOI: 10.1021/acsomega.1c01708.

41. Stainsby F.M., Hodar J., Vaughan H. Biosurfactant production by mycolic acid-containing Actinobacteria. In: Hozzein W.N. (ed.). *Actinobacteria – diversity, applications*

and medical aspects. 2022, p. 1835-2131. DOI: 10.5772/intechopen.104576.

42. Kumar R., Das A.J. Extraction, detection, and characterization of rhamnolipid biosurfactants from microorganisms. In: Kumar R., Das A.J. (eds). *Rhamnolipid biosurfactant: recent trends in production and application*. Singapore: Springer; 2018, p. 15-28. DOI: 10.1007/978-981-13-1289-2_2.

43. Pardhi D.S., Panchal R.R., Raval V.H., Joshi R.G., Poczai P., Almalki W.H., et al. Microbial surfactants: a journey from fundamentals to recent advances. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:982603. DOI: 10.3389/fmicb.2022.982603.

44. Elshikh M., Moya-Ramírez I., Moens H., Roelants S., Soetaert W., Marchant R., et al. Rhamnolipids and lactonicsophorolipids: natural antimicrobial surfactants for oral hygiene. *Journal of Applied Microbiology*. 2017;123(5):1111-1123. DOI: 10.1111/jam.13550.

45. Sowani H., Deshpande A., Gupta V., Kulkarni M., Zinjarde S. Biodegradation of squalene and n-hexadecane by *Gordonia amicalis* HS-11 with concomitant formation of biosurfactant and carotenoid. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2019;142:172-181. DOI: 10.1016/j.ibiod.2019.05.005.

46. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Philp J.C., Christofi N., Dunban S.A., Ritchkova M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods*. 2001;46(2):149-156. DOI: 10.1016/S0167-7012(01)00259-7.

47. Laorrattanasak S., Rongsayamanont W., Khondee N., Paorach N., Soonglerdsongpha S., Pinyakong O., et al. Production and application of *Gordonia westfalica* GY40 biosurfactant for remediation of fuel oil spill. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2016;227(9):325. DOI: 10.1007/s11270-016-3031-8.

48. Delegan Y., Sargsyan A., Hovhannisyan N., Babayan B., Petrikov K., Vainstein M. Analysis of genome sequence and trehalose lipid production peculiarities of the thermotoerant *Gordonia* strain. *Journal of Basic Microbiology*. 2020;60(1):14-21. DOI: 10.1002/jobm.201900439.

49. Janek T., Rodrigues L.R., Gudiña E.J., Czyżnikowska Z. Structure and mode of action of cyclic lipopeptide pseudofactin II with divalent metal ions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;146:498-506. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.06.055.

50. Garton N.J., Sutcliffe I.C. Identification of a lipoarabinomannan-like lipoglycan in the actinomycete *Gordonia bronchialis*. *Archives of Microbiology*. 2006;184(6):425-427. DOI: 10.1007/s00203-005-0050-z.

51. Silva T.P., Paixão S.M., Tavares J., Gil C.V., Torres C.A.V., Freitas F., et al. A new biosurfactant/bioemulsifier from *Gordonia alkanivorans* strain 1B: production and characterization. *Processes*. 2022;10(5):845. DOI: 10.3390/pr10050845.

52. Franzetti A., Caredda P., La Colla P., Pintus M., Tamburini E., Papacchini M., et al. Cultural factors affecting biosurfactant production by *Gordonia* sp. BS29. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2009;63(7):943-947. DOI: 10.1016/j.ibiod.2009.06.001.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Нечаева Ирина Александровна,
к.б.н., доцент, доцент,
Тульский государственный университет,
300012, г. Тула, пр. Ленина, 92,
Российская Федерация,
✉ nechaeva1902@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-2736-080X

Осина Анна Николаевна,
магистрант,
Тульский государственный университет,
300012, г. Тула, пр. Ленина, 92,
Российская Федерация,
anya.osina2017@yandex.ru
https://orcid.org/0009-0009-2661-1145

Филиппова Анастасия Сергеевна,
младший научный сотрудник,
Научно-исследовательский
центр «БиоХимТех»,
Тульский государственный университет,
300012, г. Тула, пр. Ленина, 92,
Российская Федерация,
stasya.filippova.01@gmail.com
https://orcid.org/0009-0001-6883-1543

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina A. Nechaeva,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Associate Professor,
Tula State University,
92, Lenin Ave., Tula, 300012,
Russian Federation,
✉ nechaeva1902@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-2736-080X

Anna N. Osina,
Master's Student,
Tula State University
92, Lenin Ave., Tula, 300012,
Russian Federation,
anya.osina2017@yandex.ru
https://orcid.org/0009-0009-2661-1145

Anastasia S. Filippova,
Junior Researcher,
BioChemTech Centre,
Tula State University,
92, Lenin Ave., Tula, 300012,
Russian Federation,
stasya.filippova.01@gmail.com
https://orcid.org/0009-0001-6883-1543

Нам Нгуен Ван Тхань,
магистр, научный сотрудник,
Южное отделение Совместного
Российско-Вьетнамского Тропического
научно-исследовательского
и технологического центра,
740300, г. Хо Ши Мин, ул. Третьего Февраля,
район 10, Вьетнам,
xungcavn@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-0091-5369

Мо Лыонг Тхи,
к.х.н., заведующий лабораторией,
Южное отделение Совместного
Российско-Вьетнамского Тропического
научно-исследовательского
и технологического центра,
740300, г. Хо Ши Мин, ул. Третьего Февраля,
район 10, Вьетнам,
luongmo@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-6035-5933

Nguyen V.T. Nam,
Master's Student, Researcher,
Southern Branch of Joint Vietnam-Russia
Tropical Science and Technology
Research Center,
3, 3 Thang 2 St., Distr. 10, 740300,
Ho Chi Minh City, Vietnam,
xungcavn@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-0091-5369

Luong T. Mo,
Cand. Sci. (Chemistry), Head of the Laboratory,
Southern Branch of Joint Vietnam-Russia
Tropical Science and Technology
Research Center,
3, 3 Thang 2 St., Distr. 10, 740300,
Ho Chi Minh City, Vietnam,
luongmo@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-6035-5933

Вклад авторов

И.А. Нечаева – научное руководство,
написание черновика рукописи.
А.Н. Осина – проведение исследования.
А.С. Филиппова – визуализация.
Н.В.Т. Нам – проведение исследования.
Л.Т. Мо – предоставление ресурсов,
редактирование рукописи.

Contribution of the authors

Irina A. Nechaeva – supervision,
writing – original draft.
Anna N. Osina – investigation.
Anastasia S. Filippova – visualization.
Nguyen V.T. Nam – investigation.
Luong T. Mo – resources, editing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

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 31.10.2024.
Одобрена после рецензирования 05.12.2024.
Принята к публикации 31.05.2025.

Information about the article

The article was submitted 31.10.2024..
Approved after reviewing 05.12.2024.
Accepted for publication 31.05.2025.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 579.61
EDN: NPXLVY
DOI: 10.21285/achb.982

Поиск и анализ разнообразия структур CRISPR-Cas-систем патогенных штаммов *Clostridium botulinum* с целью создания экологически безопасных фаговых препаратов

Г.А. Тетерина*✉, В.П. Саловарова*, Ю.П. Джиоев, Н.А. Арефьева*,**,***, А.Ю. Борисенко**, Ю.С. Букин*,*****, С.В. Эрдынеев**,****, Л.А. Степаненко**, Д.А. Антипин**, К.Б. Кахиани**, А.Э. Макарова****

**Иркутский государственный университет, Иркутск, Российская Федерация*
***Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Российская Федерация*
****Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Российская Федерация*
*****Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Российская Федерация*
******Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Российская Федерация*

Аннотация. *В работе представлено биоинформатическое исследование разнообразия CRISPR-Cas-систем в геномах Clostridium botulinum и детектируемых ими фагов с перспективной целью их таргетного скрининга. Объектом исследования стали 49 полных хромосомных последовательностей бактерий, взятых из базы данных GenBank. Для идентификации cas-генов использовался программный комплекс MacSyFinder с применением профилей HMM из баз данных PFAM и TIGRFAM. Поиск и анализ CRISPR-кассет осуществлялся с помощью трех независимых программ: CRISPRFinder, PILER-CR и CRISPR Recognition Tool, что обеспечило высокую точность определения структуры кассет. Поиск протоспейсеров проводился с использованием программы CRISPRTarget и алгоритма BLASTn против вирусных баз данных RefSeq-Viral. Исследование включало сопоставление последовательностей спейсеров с геномами фагов для выявления комплементарных участков. Анализ фагового иммунитета показал преобладание фагов Cellulophaga (19%), что связано с экологическими особенностями Clostridium botulinum, а также значительную долю фагов Aeromonas и Bacillus (12,5%). Следующую группу фагов, преимущественно направленных на кишечную микрофлору, составили виды Enterococcus, Escherichia, Lactococcus (6–10%). Найдены протоспейсеры редких фагов (по 3%): Acidianus filamentous, Prochlorococcus, Pseudoalteromonas, Stenotrophomonas, Synechococcus. Полученные результаты указывают на сложную структуру CRISPR-Cas-систем Clostridium botulinum, эволюционно формирующихся под влиянием различных экологических ниш.*

Ключевые слова: *Clostridium botulinum, фаговые препараты, CRISPR-Cas-система, биоинформационные алгоритмы, фаги*

Для цитирования: Тетерина Г.А., Саловарова В.П., Джиоев Ю.П., Арефьева Н.А., Борисенко А.Ю., Букин Ю.С. [и др.]. Поиск и анализ разнообразия структур CRISPR-Cas-систем патогенных штаммов *Clostridium botulinum* с целью создания экологически безопасных фаговых препаратов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 224–233. DOI: 10.21285/achb.982. EDN: NPXLVY.

© Тетерина Г.А., Саловарова В.П., Джиоев Ю.П., Арефьева Н.А., Борисенко А.Ю., Букин Ю.С., Эрдынеев С.В., Степаненко Л.А., Антипин Д.А., Кахиани К.Б., Макарова А.Э., 2025

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Identification and diversity analysis of CRISPR-Cas systems in the pathogenic strains of *Clostridium botulinum* to create eco-friendly phage preparations

Galina A. Teterina*✉, Valentina P. Salovarova*, Yuri P. Dzhioev**, Nadezhda A. Arefieva*,**,***, Andrey Yu. Borisenko**, Yuri S. Bukin*,*****, Sergey V. Erdyneev**,****, Liliya A. Stepanenko**, Dmitry A. Antipin**, Kristina B. Kakhiani**, Angeina E. Makarova**

**Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation*
***Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation*
****Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation*
*****Irkutsk Scientific Research Anti-Plague Institute of Siberia and the Far East, Irkutsk, Russian Federation*
******Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation*

Abstract. *The article presents a bioinformatic study of the diversity of CRISPR-Cas systems in the genomes of Clostridium botulinum and the phages they detect, with the aim of their targeted screening. The subject matter of the study was 49 complete chromosomal sequences of bacteria obtained from the GenBank database. Cas genes were identified employing the MacSyFinder tool with the use of HMM profiles from the PFAM and TIGRFAM databases. The identification and analysis of CRISPR cassettes were performed using three independent programs: CRISPRFinder, PILER-CR, and CRISPR Recognition Tool, which ensured high accuracy in determining the cassette structure. Protospacers were identified using the CRISPRTarget tool and the BLASTn algorithm against RefSeq-Viral viral databases. The study involved comparing spacer sequences and phage genomes in order to identify complementary sites. A phage immunity analysis revealed a predominance of Cellulophaga phages (19%), which can be attributed to the environmental characteristics of Clostridium botulinum, as well as a significant proportion of Aeromonas and Bacillus phages (12.5%). Another group of phages (predominantly intestinal) included Enterococcus, Escherichia, and Lactococcus species (6–10%). Also, the protospacers of rare phages (3% each) were found: Acidianus filamentous, Prochlorococcus, Pseudoalteromonas, Stenotrophomonas, and Synechococcus. The obtained results indicate complex CRISPR-Cas systems in Clostridium botulinum, evolving under the impact of different ecological niches.*

Keywords: *Clostridium botulinum, phage preparations, CRISPR-Cas system, bioinformatic algorithms, phages*

For citation: Teterina G.A., Salovarova V.P., Dzhioev Yu.P., Arefieva N.A., Borisenko A.Yu., Bukin Yu.S, et al. Identification and diversity analysis of CRISPR-Cas systems in the pathogenic strains of *Clostridium botulinum* to create eco-friendly phage preparations. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2):224-233. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.982. EDN: NPXLVY.

ВВЕДЕНИЕ

В современной медицине остается актуальной проблема инфекций, вызываемых *Clostridium botulinum* – анаэробной грамположительной палочкой, образующей устойчивые к физическим факторам споры и широко распространенной в природе. Данные бактерии являются возбудителями ботулизма – тяжелой пищевой токсикоинфекции, вызываемой ботулиническим токсином и характеризуемой глубоким поражением нервной системы. Ботулинические нейротоксины (botulinum neurotoxin, BoNT) – это белковые токсины, которые распределены по нескольким группам грамположительных облигатно анаэробных бактерий вида *C. botulinum.* Определены четыре генетически различные бактериальные группы *C. botulinum* (I–IV). В то же время семь различных серотипов синтезируемых белковых нейротоксинов (типы A–G) включают: группу I (протеолитические, продуцирующие нейротоксины A, B и F), группу II (непротеолитические, продуцирующие нейротоксины B, E и F), группу III (продуцирующие нейротоксины C и D) и группу IV (продуцирующие нейротоксин G). Нейротоксины типов A, B, E и иногда F в основном связаны с ботулизмом у людей. Гены данных нейротоксинов могут встречаться как в конъюгативных плазмидах, так и в хромосомно интегрированных островах патогенности *C. botulinum* [1–6]. BoNT, вырабатываемые *C. botulinum*, поражают двигательные нейроны и подавляют высвобождение ацетилхолина, что приводит к нервно-мышечной блокаде. Вызываемое BoNT заболевание – ботулизм – без лечения часто заканчивается летальным исходом. Наиболее рас-

пространенной формой ботулизма у взрослых является пищевой ботулизм, который возникает в результате приема предварительно сформированного BoNT в консервированных продуктах. Еще более опасен детский ботулизм, возникающий у детей и младенцев, который отличается от пищевого ботулизма тем, что вызывается не употреблением готового токсина, а развитием в кишечнике бактерий *C. botulinum*, которые производят токсин. Данная форма заболевания требует лечения, направленного на подавление роста возбудителя *C. botulinum* [2, 4, 6].

Природный штамм *C. botulinum* G1 является причиной значительной части случаев пищевого ботулизма и зафиксирован как основной источник детского ботулизма из-за колонизации их кишечника бактериями, продуцирующими BoNT, остается множество вопросов относительно средств и ограничительных барьеров для горизонтального переноса кластера генов BoNT у этого вида. Было проведено исследование, в ходе которого плазмида pCLJ, несущая ген BoNT G1 *C. botulinum*, была экспериментально перенесена посредством конъюгации в виды *C. sporogenes, C. butyricum* и G3 *C. botulinum*, что засвидетельствовало возможность межвидового и внутривидового переноса плазмид. В то же время плазмиды являются основным мобильным генетическим элементом, связанным с BoNT, у большинства видов BoNT (+) фаг несет гены BoNT/C и D в G3 *C. botulinum*. Было выявлено, что гены BoNT/C и D в G3 *C. botulinum* находятся в области профага, которая была экспериментально удалена. Показано, что ввиду их отсутствия устранялась токсичность штамма. Подобная динамика не наблюдалась в других группах видов. Хотя профаги редко обнаруживались вблизи определенных мест вставки BoNT в нескольких штаммах G1 *C. botulinum*, в настоящее время нет дополнительных доказательств, которые указывали бы на фаг как на движущую силу распространения фактора вирулентности BoNT в G1 *C. botulinum* или *C. sporogenes* [6, 7].

При колонизации *C. botulinum* кишечника человека без незамедлительного и эффективного лечения возникает высокая вероятность летального исхода – до 80%. Антибиотикотерапия из-за множественной устойчивости бактерии становится неэффективной и является причиной возникновения новых высокопатогенных форм бактерий, что влияет на исход успешного выздоровления. В связи с этим, чтобы вернуть прежние позиции в области антибактериальной терапии в отношении клостридий, необходимы новые экологически безопасные подходы к поиску и созданию эффективных способов и технологий борьбы с данными патогенными микроорганизмами. На сегодняшний день основным специфическим лечением при ботулизме является внутривенное введение гетерологичной (лошадиной) противоботулинической сыворотки типов A, B, E в максимально короткие сроки после появления симптомов. Антитоксин входит в стандарт лечения при ботулинической инфекции и имеет доказанную эффективность. Тем не менее восстановление нарушенных в результате отравления нейротоксином функций занимает длительное время, что подтверждается свидетельствами заболевших [3, 8].

Одним из способов лечения бактериальных инфекций является терапия фагами, нейтрализующими соответствующий патогенный вид бактерий. Разработка безопасных препаратов фаговой терапии на первом своем этапе включает биоинформационное изучении системы «адаптивного иммунитета» бактерий CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). CRISPR-Cas защищает бактерии от внедрения чужеродных генетических элементов путем нацеливания на участки их генома комплементарных фрагментов нуклеиновых кислот. CRISPR-локус представляет собой набор коротких палиндромных нуклеотидных повторов, разделенных спейсерами – участками ДНК или РНК фагов. Локус, содержащий перемежающиеся спейсерами повторы, далее экспрессируется в малую направляющую РНК CRISPR (crRNA), которая направляет фермент Cas9 к определенной последовательности ДНК фагов или плазмид для их расщепления. Основанная на белках Cas-система CRISPR-Cas классифицируется в соответствии с принятой системой классификации и подразделяется на два класса: класс 1 – эффекторный комплекс, образованный несколькими белками Cas; класс 2, в котором эффектором является один большой многодоменный белок. Классы систем CRISPR/Cas подразделяются на несколько типов, которые состоят из отдельных адаптационных и эффекторных модулей [7, 9–14]. В настоящее время CRISPR-Cas-системы нашли широкое применение в биоинженерии и биотехнологии для редактирования геномов эмбрионов растений и животных, в области терапии рака, они также применяются в качестве противомикробного средства против патогенных бактерий и даже для борьбы с новым коронавирусом SARS-CoV-2 [8, 15–18]. CRISPR-Cas-системы в роли адаптивных иммунных модулей хозяина могут использоваться для получения прямого представления о событиях горизонтального переноса генов, в том числе генов патогенности между различными штаммами и видами бактерий [19–23].

К сожалению, на сегодняшний день существует очень мало исследований о спектрах бактериофагов, к которым могут быть адаптированы различные штаммы *C. botulinum.* Получение этой информации напрямую при посевах *C. botulinum* и заражении колоний различными видами фагов затруднительно в связи с высокой патогенностью анаэробной бактерии и сложностью работы с ней в лабораториях. Другим способом получения информации о спектрах вирусов, к которым устойчива *C. Botulinum*, может являться биоинформационный анализ по поиску в полногеномных данных CRISPR-Cas-систем, а также анализ сходства спейсеров (протоспейсеров) в этих системах с фрагментами геномов различных бактериофагов. Анализ CRISPR-Cas-систем *C. botulinum* с помощью методов биоинформатики на предварительном этапе скрининга позволит избежать случаев внутрилабораторного заражения при культивировании бактерий, а также сократит время для получения эффективных препаратов фаговой терапии, нацеленных только на патогенный возбудитель ботулизма [24].

В связи с вышеуказанным целью проведенного исследования являлось осуществление биоинформатического анализа разнообразия CRISPR-Cas-систем в геномах *C. botulinum* и определение спектров детектируемых ими фагов с перспективой их таргетного скрининга против данных патогенов на основе полногеномных данных базы GenBank.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования стали полногеномные последовательности *C. Botulinum*, выбранные из базы данных GenBank. Для анализа были взяты только 49 геномов, собранных до полной кольцевой хромосомы (табл. 1). Для всех 49 геномов была проведена реаннотация белок-кодирующих генов с помощью онлайн-приложения GeneMarkS 4.28[1].

Таблица 1. Проанализированные геномы с номерами базы GenBank

Table 1. Analyzed genomes with GenBank base numbers

Геном *Clostridium botulinum* NCBI ID	Подтип CRISPR-Cas	Количество спейсеров
CP013296.1	–	9
CP013681.1	–	9
CP063816.1	I-B	81
CP010520.1	–	17
CP010521.1	–	17
CP001078.1	–	18
CP000727.1	III-B	20
FR745875.1	–	15
CP001056.1	–	15
CP013707.1	–	3
CP028842.1	III-B	20
CP000726.1	III-B	20
CP013247.1	–	3
CP006903.1	–	1
CP046450.1	III-B	19
AM412317.1	III-B	19
CP006907.1	III-D	15
AP014696.1	I-B	72
CP013841.1	I-B	18
CP059677.1	–	18
CP013849.1	–	5
FR773526.1	III-B	25
CP028859.1	I-B	73
CP013845.1	–	4
CP031097.1	III-B	18
CP013683.1	I-B	15
CP014151.1	–	21
CP013843.1	III-B	36
CP014148.1	–	17
CP031098.1	–	18
CP013686.1	III-A	8
CP000939.1	III-D	18
CP014219.1	–	4
CP001083.1	III-B	18
CP027780.1	–	
CP000962.1	–	3
CP002011.1	III-B	26
CP013705.1	–	5
CP000728.1	III-B	26
CP027779.1	III-B	131
CP027781.1	III-B	131
CP014174.1	III-A	7
CP013850.1	III-A	27
CP006902.1	–	18
CP013246.1	I-B	22
CP006908.1	III-B	17
CP013847.1	–	21
CP001581.1	–	24

Идентификация *cas*-генов среди предсказанных рамок считывания проводилась с помощью онлайн-приложений MacSyFinder[2], PILER-CR[3], CRISPR Recognition Tool[4]. Результаты по поиску Cas по всем вышеперечисленным приложениям объединены в единый массив данных. По положению в геноме Cas-генов были идентифицированы нуклеотидные последовательности протоспейсеров – участков чужеродной ДНК или РНК, которые распознаются и разрезаются системой CRISPR-Cas для зашиты от бактериофагов.

Идентификация принадлежности протоспейсеров к определенным таксонам бактериофагов была проведена с помощью программы CRISPRTarget[5], использующей алгоритм парного выравнивания BLASTn против вирусных баз данных RefSeq-Viral (13528 последовательностей).

В каждом из 49 исследованных геномов были обнаружены Cas-гены и CRISPR-Cas-системы. Все выявленные кластеры генов cas принадлежат к классу I и относятся преимущественно к типу III (20/27) генов, которые используются иммунной системой бактерий для обеспечения противовирусного иммунитета через двойной механизм разрушения РНК и ДНК. В большинстве CRISPR-Cas-кассет один и тот же консенсусный повтор – TAAATACATCTCATGTTAATGTTCAAC (рис. 1). Данный повтор по структуре нуклеотидной последовательности принадлежит к суперклассу A, который, в свою очередь, встречается у различных видов бактерий и архей. Наличие такого повтора, переназначение которого заключается в совместном участии вместе с другими компонентами системы, такими как crRNA (CRISPR РНК) и Cas-белки, в разрушении ДНК чужеродного генетического материала, свидетельствует о том, что в естественной среде *C. botulinum* действительно контактирует с различными бактериофагами, участвующими в регуляции ее численности.

Количество участков, кодирующих протоспейсеры, в исследованных штаммах *C. botulinum* варьировало от 1 до 13 (см. табл. 1). Всего было выделено 204 варианта различных протоспейсеров.

Из всего разнообразия протоспейсеров потенциальные мишени – бактериофаги – были идентифицированы для 37 протоспейсеров (табл. 2). По принадлежности к потенциальным хозяевам идентифицированные бактериофаги могут паразитировать на

[1] GeneMarkS // Exon.gatech.edu. Режим доступа: https://exon.gatech.edu/genemarks.cgi (дата обращения: 04.07.2024).
[2] MacSyFinder // Github.com. Режим доступа: https://github.com/gem-pasteur/macsyfinder (дата обращения: 04.07.2024).
[3] PILER-CR // Drive5.com. Режим доступа: https://www.drive5.com/piler/ (дата обращения: 22.01.2025).
[4] CRISPR Recognition Tool // Room220.com. Режим доступа: http://www.room220.com/crt/ (дата обращения: 04.07.2024).
[5] CRISPRTarget // Crispr.otago.ac.nz. Режим доступа: https://crispr.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html (дата обращения: 04.07.2024).

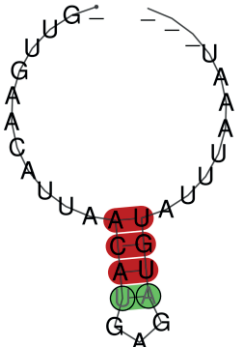


Рис. 1. Реконструированная вторичная структура консенсусного повтора CRISPR-Cas *Clostridium botulinum*

Fig. 1. Reconstructed secondary structure of the *Clostridium botulinum* consensus CRISPR-Cas repeat

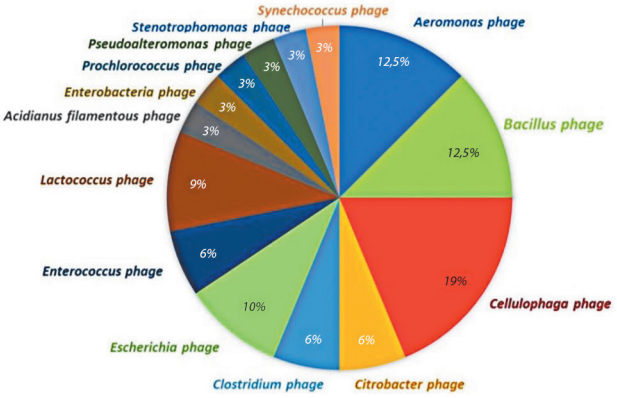


Рис. 2. Спектр фагов (на уровне рода поражаемых бактерий), фрагменты геномов которых были идентифицированы среди протоспейсеров выборки из 49 геномов *Clostridium botulinum*

Fig. 2. Phage spectrum (at the level of the genus of bacteria affected) whose genome fragments have been identified among the protospacers of a sample of 49 *Clostridium botulinum* genomes

представителях 14 различных родов бактерий (рис. 2), среди которых доминировали *Cellulophaga, Aeromonas, Bacillus, Escherichia, Lactococcus, Clostridium, Citobacte.*

Самой многочисленной группой возбудителей оказались бактериофаги бактерий рода *Cellulophaga* (19%), обитающих в морских водорослях. Вторыми по численности стали виды фагов, поражающих бактерии родов *Aeromonas* и *Bacillus phage* (12,5%). Бактерии рода *Aeromonas* обитают в воде и могут выступать еще и в роли патогена для человека. Бактерии рода *Bacillus* входят в состав здоровой микробиоты желудочно-кишечного тракта человека и животных. Третью группу составили фаги, поражающие бактерии родов *Clostridium*, *Enterococcus* (6%), *Escherichia* (10%), *Lactococcus* (9%). Отличительной чертой данной группы является преимущественное количество (3/4) фагов, направленных на полезные бактерии желудочно-кишечного тракта человека. Четвертая группа представлена одним видом

Таблица 2. Протоспейсеры, для которых были идентифицированы бактериофаги

Table 2. Protospacers for which bacteriophages have been identified

Идентификатор в NCBI RefSeq	Фаг	Длина протоспейсера	Последовательность спейсера
NC_001629.1	*Lactococcus* phage bIL67	20	GCAGCTATATTAAACAACTAATCGAAAAGGATAT
NC_028671.1	*Enterococcus phage* vB_EfaS_IME197	20	TTCAAACACTCCTTTAATTAGAAAAGGAGAAATAAT
NC_029094.1	*Pseudoalteromonas* phage *H*101	20	GATAAACAAGAAGAAGCTATGATGTTTGCTACAAAC
NC_015262.1	*Clostridium* phage *phi*CD6356	36	AATAGAGTATTCAGATGAATATAAATTCTTGGAAGA
NC_021788.1	*Cellulophaga* phage *phi4:1*	20	GAAAAAGGTAAATTAGCAAGTGCAAAAGATTTAGA
NC_021798.1	*Cellulophaga* phage *phi17:2*	20	GAAAAAGGTAAATTAGCAAGTGCAAAAGATTTAGA
NC_008265.1	*Clostridium* phage *phiSM101*	20	ATTTTCATAATGTTTTAATGTAGTAATTACTATTTG
NC_021789.1	*Cellulophaga* phage phi19*:3*	21	TCATCAATTTTCATACCATCAAATTGATTATTTGC
NC_021799.1	*Cellulophaga* phage phi19*:1*	21	TCATCAATTTTCATACCATCAAATTGATTATTTGC
NC_015262.1	*Clostridium* phage *phiCD6356*	36	AATAGAGTATTCAGATGAATATAAATTCTTGGAAGA
NC_021788.1	*Cellulophaga* phage *phi4:1*	20	GAAAAAGGTAAATTAGCAAGTGCAAAAGATTTAGA
NC_021798.1	*Cellulophaga* phage phi17*:2*	20	GAAAAAGGTAAATTAGCAAGTGCAAAAGATTTAGA
NC_006883.2	*Prochlorococcus* phage P-SSM2	31	TACAAATCCAAAAGAAATTGATTTAAATCAAATAAA
NC_010537.1	*Acidianus filamentous* virus *9*	25	GCGTCCTTATCTTCTATACTCCACACAAGTTCCCTT
NC_028826.1	*Enterococcus* phage IME-EFm5	20	TTTTATTATAAAATAGAAA
NC_008208.1	*Aeromonas* virus *25*	25	CTATAAGAGATTCAAAAGGAAATATTATTAAAATTTA
NC_012663.1	*Lactococcus* phage P087	20	CGGAATTCCTTTGGAGATAAAAGGATTTGAACCTC
NC_014635.1	*Aeromonas* phage phiAS4	25	CTATAAGAGATTCAAAAGGAAATATTATTAAAATTTA
NC_019543.1	*Aeromonas* phage Aes508	25	CTATAAGAGATTCAAAAGGAAATATTATTAAAATTTA
NC_020879.1	*Aeromonas* phage Aes012	25	CTATAAGAGATTCAAAAGGAAATATTATTAAAATTTA
NC_021861.1	*Lactococcus* phage BM13	24	GCTTTTATAATGCTTAATGTTTTTATAGTTTCTTC
NC_025447.1	*Escherichia* phage 121Q	20	TAAAGAAGAATGTAAAAAATGTAAATGCAAATATTG
NC_027364.1	*Escherichia* phage PBECO 4	20	TAAAGAAGAATGTAAAAAATGTAAATGCAAATATTG

фагов *Citrobacter phage* (6%) – его действие направленно на бактерии рода *Citrobacter*, некоторые виды которого обитают в кишечнике человека, являясь представителями условно-патогенной микробиоты. Пятая группа представлена одиночными соответствиями фагов, на каждый из которых приходится 3% встречаемости. В состав данной группы входят *Acidianus filamentous phage, Prochlorococcus phage, Pseudoalteromonas phage, Stenotrophomonas phage, Synechococcus phage.*

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате анализа разнообразия протоспейсеров в 49 полных геномах исследованных штаммов *C. botulinum* было установлено, что бактерии данной группы могли потенциально инфицироваться различными группами бактериофагов, близкие родственники которых инфицируют бактерии, обитающие в различных природных средах. Все бактерии-носители этих бактериофагов можно поделить на три большие группы: 1 – бактерии в естественных условиях обитания (бактерии, ассоциированные с природной средой, почвой, водой, растениями); 2 – бактерии-симбионты человека и условно-патогенная микробиота человека; 3 – патогенные бактерии и условно патогенные для человека бактерии, которые могут обитать в окружающей среде (смешанная группа). В связи с этим места приобретения иммунитета у *C. botulinum* к различным бактериофагам также можно поделить на три группы 1 – в естественных условиях обитания; 2 – при заражении человека; 3 – смешанная группа, которая выступает в качестве условных патогенов или также обитает в естественных условиях (рис. 3).

Как уже упоминалось ранее, в некоторых полных геномах *C. botulinum* было обнаружено от 10 до 13 протоспейсеров. В геномах штаммов CP027779.1 и CP027781.1 было идентифицировано 13 протоспейсеров. Данный штамм был изолирован в мае 2004 г. на рыбном рынке в городе Кочин штата Карела Индии. Для штамма CP028859.1, содержащего 10 протоспейсеров, в аннотации полного генома указанно, что данный номер относится к полному геному штамма CFSAN064329, поддерживаемого и культивируемого лабораторией Управления по контролю за продуктами и лекарствами (*англ.:* Food and Drug Administration) США, исходное происхождение штамма неизвестно. Штамм AP014696.1, содержащий 9 протоспейсеров, был изолирован в процессе анализа при семейной вспышке ботулизма в префектуре Ишикава Японии в 1995 г. Для штамма CP002011.1, содержащего 8 протоспейсеров, в аннотации полного генома указанно, что данный номер относится к полному геному штамма F str. 230613, изолированного в Китае в период до 2010 г. Из описания наиболее устойчивых штаммов видов следует, что они могут быть изолированы в различных регионах мира с преимущественно теплым климатом как от человека при вспышке забивания, так и из окружающей среды.

Рис. 3. Соотношение потенциальных мест приобретения иммунитета к фагам штаммов *Clostridium botulinum*, полученное на основе анализа характеристик близкородственных к протоспейсерам вирусов

Fig. 3. Ratios of potential sites of immunity acquisition to phages of *Clostridium botulinum* strains based on the characteristics of viruses closely related to protospacers

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования бактерий *C. botulinum* с помощью биоинформационных методов в геномах 49 штаммов были обнаружены полные CRISPR-Cas-системы и CRISPR-кассеты. Количество протоспейсеров, отвечающих за устойчивость к фагам, варьировала от 1 до 13. Из общего количества 204 протоспейсеров для 33 были идентифицированы бактериофаги со схожими участками геномной последовательности. По своей природе идентифицированные бактериофаги поражают различные виды бактерий, обитающих в контрастных природных условиях, либо бактерии, ассоциированные с организмом человека. Полученный таким образом спектр бактериофагов можно исключить из потенциальных кандидатов для проведения терапии против *C. botulinum.*

REFERENCES

1. Hill K.K., Smith T.J. Genetic diversity within *Clostridium botulinum* serotypes, botulinum neurotoxin gene clusters and toxin subtypes. In: Rummel A., Binz T. (eds). *Botulinum Neurotoxins. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin: Springer; 2012, vol. 364, p. 1-20. DOI: 10.1007/978-3-642-33570-9_1.

2. Zhang S., Masuyer G., Zhang J., Shen Y., Lundin D., Henriksson L., et al. Identification and characterization of a novel botulinum neurotoxin. *Nature Communication*. 2017:14130. DOI: 10.1038/ncomms14130.

3. Bowe B.K., Wentz T.G., Gregg B.M., Tepp W.H., Schill K.M., Sharma S., et al. Genomic diversity, competition, and toxin production by group I and II *Clostridium botulinum* strains used in food challenge studies. *Microorganisms*. 2022;10(10):1895. DOI: 10.3390/microorganisms10101895.

4. Carter A.T., Peck M.W. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* group I and group II. *Research in Microbiology*. 2015;166(4):303-317. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.10.010.

5. Brunt J., van Vliet A.H.M., Stringer S.C., Carter A.T., Lindström M., Peck M.W. Pan-genomic analysis of *Clos-*

tridium botulinum group II (non-proteolytic *C. botulinum*) associated with foodborne botulism and isolated from the environment. *Toxins*. 2020;12(5):306. DOI: 10.3390/toxins12050306.

6. Smith T.J., Williamson C.H.D., Hill K.K., Johnson S.L., Xie G., Anniballi F., et al. The distinctive evolution of *orfX Clostridium parabotulinum* strains and their botulinum neurotoxin type A and F gene clusters is influenced by environmental factors and gene interactions via mobile genetic elements. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:566908. DOI: 10.3389/fmicb.2021.566908.

7. Nawrocki E.M., Bradshaw M., Johnson E.A. Botulinum neurotoxin-encoding plasmids can be conjugatively transferred to diverse clostridial strains. *Scientific Reports*. 2018;8:3100. DOI: 10.1038/s41598-018-21342-9.

8. Yang L., Ning Q., Tang S.-S. Recent advances and next breakthrough in immunotherapy for cancer treatment. *Journal of Immunology Research*. 2022:8052212. DOI: 10.1155/2022/8052212.

9. Alkhnbashi O.S., Meier T., Mitrofanov A., Backofen R., Vob B. CRISPR-Cas bioinformatics. *Methods*. 2020;172:3-11. DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.07.013.

10. Butiuc-Keul A., Farkas A., Carpa R., Iordache D. CRISPR-Cas system: the powerful modulator of accessory genomes in prokaryotes. *Microbial Physiology*. 2022;32 (1-2):2-17. DOI: 10.1159/000516643.

11. Tang Y., Gao L., Feng W., Guo C., Yang Q., Li F., et al. The CRISPR-Cas toolbox for analytical and diagnostic assay development. *Chemical Society Reviews*. 2021;50(21):11844-11869. DOI: 10.1039/D1CS00098E.

12. Koonin E.V., Makarova K.S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philosophic Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*. 2019;374(1772):20180087. DOI: 10.1098/rstb.2018.0087.

13. Koonin E.V., Makarova K.S. Mobile genetic elements and evolution of crispr-cas systems: all the way there and back. *Genome Biology and Evolution*. 2017;9(10):2812-2825. DOI: 10.1093/gbe/evx192.

14. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*. 2017;37:67-78. DOI: 10.1016/j.mib.2017.05.008.

15. Bhatia S., Pooja, Yadav S.K. CRISPR-Cas for genome editing: Classification, mechanism, designing and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;238:124054. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124054.

16. Chen C., Wang Z., Qin Y. CRISPR/Cas9 system: recent applications in immuno-oncology and cancer immunotherapy. *Experimental Hematology and Oncology*. 2023;12(1):95. DOI: 10.1186/s40164-023-00457-4.

17. Bhokisham N., Laudermilch E., Traeger L.L., Bonilla T.D., Ruiz-Estevez M., Becker J.R. CRISPR-Cas system: the current and emerging translational landscape. *Cells*. 2023;12(8):1103. DOI: 10.3390/cells12081103.

18. Huang S., Dai R., Zhang Z., Zhang H., Zhang M., Li Z., et al. CRISPR/Cas-based techniques for live-cell imaging and bioanalysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(17):13447. DOI: 10.3390/ijms241713447.

19. Van der Oost J., Westra E.R., Jackson R.N., Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology*. 2014;12(7):479-492. DOI: 10.1038/nrmicro3279.

20. Behler J., Hess W.R. Approaches to study CRISPR RNA biogenesis and the key players involved. *Methods*. 2020;172:12-26. DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.07.015.

21. Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2015;13:722-736. DOI: 10.1038/nrmicro3569.

22. Pursey E., Dimitriu T., Paganelli F.L., Westra E.R., van Houte S. CRISPR-Cas is associated with fewer antibiotic resistance genes in bacterial pathogens. *Philosophic Transactions of the Royal Society B. Bioялogical Sciences*. 2022;377:20200464. DOI: 10.1098/rstb.2020.0464.

23. Negahdaripour M., Nezafat N., Hajighahramani N., Rahmatabadi S.S., Ghasemi Y. Investigating CRISPR-Cas systems in *Clostridium botulinum* via bioinformatics tools. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017;54:355-373. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.06.027.

24. Wentz T.G., Tremblay B.J.M., Bradshaw M., Doxey A.C., Sharma S.K., Sauer J.-D., et al. Endogenous CRISPR-Cas systems in group I *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes* do not directly target the botulinum neurotoxin gene cluster. *Frontiers in Microbiology*. 2022;12:787726. DOI: 10.3389/fmicb.2021.787726.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Тетерина Галина Александровна,
аспирант,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
✉ galina.teterina.91@mail.ru
https://orcid.org/0009-0007-0487-8223

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

Galina A. Teterina,
Postgraduate Student,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
✉ galina.teterina.91@mail.ru
https://orcid.org/0009-0007-0487-8223

Valentina P. Salovarova,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Head of the Department,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
vsalovarova@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-3693-9058

Джиоев Юрий Павлович,
к.б.н., ведущий научный сотрудник,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
alanir07@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-5410-5113

Yurii P. Dzhioev,
Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
alanir07@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-5410-5113

Арефьева Надежда Александровна,
аспирант,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
лаборант-исследователь,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
младший научный сотрудник,
Научный центр проблем здоровья семьи
и репродукции человека,
664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16,
Российская Федерация,
arefieva.n4@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-2222-4518

Nadezhda A. Arefieva,
Postgraduate Student,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
Clinical Research Assistant,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya, St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
Junior Researcher,
Scientific Centre for Family Health
and Human Reproduction Problems,
16, Timiryazev St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
arefieva.n4@gmail.com
https://orcid.org/0000-0003-2222-4518

Борисенко Андрей Юрьевич,
к.б.н., доцент,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
89500720225@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-5410-5113

Andrey Y. Borisenko,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
89500720225@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-5410-5113

Букин Юрий Сергеевич,
к.б.н.,
доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
старший научный сотрудник,
Лимнологический институт СО РАН,
664003, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3,
Российская Федерация,
bukinyura@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-4534-3846

Yuri S. Bukin,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
Senior Researcher,
Limnological Institute, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences,
3, Ulanbatorskaya St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
bukinyura@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-4534-3846

Эрдынеев Сергей Викторович,
аспирант,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
младший научный сотрудник,
Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Сибири
и Дальнего Востока,
664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78,
Российская Федерация,
orry230@yandex.ru
https://orcid.org/0009-0006-7937-1382

Sergey V. Erdyneev,
Postgraduate Student,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation;
Junior Researcher,
Irkutsk Scientific Research Anti-Plague Institute
of Siberia and the Far East,
78, Trilisser St., Irkutsk, 664047,
Russian Federation,
orry230@yandex.ru
https://orcid.org/0009-0006-7937-1382

Степаненко Лилия Александровна,
к.м.н., старший научный сотрудник,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
steplia@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-5792-7283

Антипин Дмитрий Андреевич,
аспирант,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
mieshamecka@yandex.ru
https://orcid.org/0009-0003-9442-9907

Кахиани Кристина Бесиковна,
лаборант,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
kagkkris12@gmail.com
https://orcid.org/0009-0000-7901-7056

Макарова Ангелина Эдуардовна,
лаборант,
Иркутский государственный
медицинский университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
eamak18@mail.ru
https://orcid.org/0009-0004-2207-5668

Liliya A. Stepanenko,
Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
steplia@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-5792-7283

Dmitry A. Antipin,
Postgraduate Student,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
mieshamecka@yandex.ru
https://orcid.org/0009-0003-9442-9907

Kristina B. Kakhiani,
Laboratory Assistant,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
kagkkris12@gmail.com
https://orcid.org/0009-0000-7901-7056

Angelina E. Makarova,
Laboratory Assistant,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
eamak18@mail.ru
https://orcid.org/0009-0004-2207-5668

Вклад авторов

Г.А. Тетерина – проведение исследования, написание черновика рукописи, визуализация.
В.П. Саловарова – административное руководство исследовательским проектом, научное руководство, редактирование рукописи.
Ю.П. Джиоев – разработка концепции, научное руководство, предоставление ресурсов, курирование данных, формальный анализ.
Н.А. Арефьева – разработка программного обеспечения, валидация результатов.
А.Ю. Борисенко – разработка методологии, проведение исследования.
Ю.С. Букин – предоставление ресурсов, научное руководство, разработка программного обеспечения, валидация результатов, редактирование рукописи.
С.В. Эрдынеев – проведение исследования, визуализация.
Л.А. Степаненко – проведение исследования, предоставление ресурсов, курирование данных, формальный анализ.
Д.А. Антипин – проведение исследования.
К.Б. Кахиани – проведение исследования.
А.Э. Макарова – проведение исследования.

Contribution of the authors

Galina A. Teterina – investigation, writing – original draft, visualization.
Valentina P. Salovarova – project administration, supervision, editing.
Yuri P. Dzhioev – conceptualization, supervision, resources, data curation, formal analysis.
Nadezhda A. Arefieva – software, validation.
Andrey Yu. Borisenko – methodology, investigation.
Yuri S. Bukin – resources, supervision, software, validation, editing.
Sergey V. Erdyneev – investigation, visualization.
Liliya A. Stepanenko – investigation, resources, data curation, formal analysis.
Dmitry A. Antipin – investigation.
Kristina B. Kakhiani – investigation.
Angeina E. Makarova – investigation.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

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

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

Информация о статье

Поступила в редакцию 17.09.2024.
Одобрена после рецензирования 08.12.2024.
Принята к публикации 31.05.2025.

Information about the article

The article was submitted 17.09.2024.
Approved after reviewing 08.12.2024.
Accepted for publication 31.05.2025.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 577.19:579.674
EDN: GXVAXF
DOI: 10.21285/achb.980

Перспективы использования меланина в качестве антибактериального агента потребительской упаковки

Я.В. Уразова*, Е.Д. Рожнов✉, М.Н. Школьникова****

**Бийский технологический институт (филиал) Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова, Бийск, Российская Федерация*
***Уральский государственный экономический университет, Екатеринбург, Российская Федерация*

Аннотация. *Меланины, обладая высокой физиологической активностью и функциональными свойствами, в числе прочего представляют интерес как антибактериальные агенты в составе пищевых систем и потребительской упаковки продуктов. Проведенная работа была посвящена изучению противомикробной активности меланина из лузги гречихи в отношении ряда микроорганизмов бактериальной микрофлоры сыров промышленного производства. Объектами исследования являлись очищенный меланин, полученный из лузги гречихи, и тест-культуры Penicillium roqueforti, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus и Lactobacillus plantarum. В ходе работы использовали диско-диффузионный метод и культивирование тест-культур в присутствии меланина. Статистическую обработку результатов исследований проводили с применением пакета Statistica 10. В ходе проведенного анализа установлена антимикробная активность меланина в отношении грамположительных бактерий Bacillus subtilis B-12587 и Penicillium roqueforti F-1311, в максимальной исследуемой концентрации зона лизиса при культивировании клеток Bacillus subtilis B-12587 составляет 26,4±0,2 мм, что в 1,28 раза больше зоны лизиса клеток Penicillium roqueforti F-1311, в 1,43 раза больше зоны лизиса клеток Bacillus pumilus B-7308 и в 1,58 раза больше зоны лизиса клеток Lactobacillus plantarum B-3242. В эксперименте показано, что существует высокая корреляционная связь (r = 0,97) между концентрацией меланина в среде и подавлением роста клеток Bacillus subtilis B-1258. Полученные в работе данные свидетельствуют о перспективности исследований по использованию растительных меланинов в качестве противомикробных агентов в составе пищевых пленок для первичной упаковки продуктов питания.*

Ключевые слова: *лузга гречихи, меланин, противомикробная активность, Penicillium roqueforti, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Lactobacillus plantarum*

Для цитирования: Уразова Я.В., Рожнов Е.Д., Школьникова М.Н. Перспективы использования меланина в качестве антибактериального агента потребительской упаковки // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 234–242. DOI: 10.21285/achb.980. EDN: GXVAXF.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Prospects of using melanin as an antimicrobial agent in food packaging

Yana V. Urazova*, Evgeny D. Rozhnov✉, Marina N. Shkolnikova****

**Biysk Technological Institute (branch) of the Altai State Technical University, Biysk, Russian Federation*
***Ural State University of Economics, Ekaterinburg, Russian Federation*

Abstract. *Melanin, known for its high physiological activity and functional properties, has attracted research interest as a potential antimicrobial agent in food systems and consumer packaging. This study investigated the antimicrobial activity of melanin derived from buckwheat hulls against the bacterial microbiota present in industrially produced*

© Уразова Я.В., Рожнов Е.Д., Школьникова М.Н., 2025

cheeses. The research objects were purified melanin obtained from buckwheat hulls and the following microbial strains: Penicillium roqueforti, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, and Lactobacillus plantarum. The disc-diffusion method and the cultivation of test strains in the presence of melanin were employed. Statistical analysis was carried out using Statistica 10 software. The study confirmed the antimicrobial activity of melanin against Gram-positive bacteria Bacillus subtilis B-12587 and Penicillium roqueforti F-1311. At the highest tested concentration, the zone of lysis for Bacillus subtilis B-12587 was 26.4±0.2 mm, which was 1.28 times larger than that of Penicillium roqueforti F-1311 cells, 1.43 times larger than that of Bacillus pumilus B-7308 cells, and 1.58 times larger than that of Lactobacillus plantarum B-3242 cells. A strong correlation (r = 0.97) was identified between melanin concentration in the medium and the growth inhibition of Bacillus subtilis B-12587. These findings highlight the potential of plant-derived melanins as antimicrobial agents in food-grade films intended for primary packaging.

Keywords: *buckwheat hull, melanin, antimicrobial activity, Penicillium roqueforti, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Lactobacillus plantarum*

For citation: Urazova Ya.V., Rozhnov E.D., Shkolnikova M.N. Prospects of using melanin as an antimicrobial agent in food packaging. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2):234-242. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.980. EDN: GXVAXF.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время растет не только научный, но и практический интерес к природным пигментам, в частности меланинам – высокомолекулярным гидрофобным пигментам с высокой физиологической активностью и функциональными свойствами. Различают меланины растительного и животного происхождения, получаемые экстракцией сырья, в том числе с использованием ферментных препаратов, и микробного происхождения, получаемые химическим и микробиологическим синтезом (рис. 1). Меланины животного и растительного происхождения различны по молекулярному составу и физико-химическим свойствам [1].

Как видно из приведенных на рис. 1 данных, источники меланина весьма разнообразны по своей природе и видам. Некоторые из них, такие как чернила кальмара, сепии, семена арбуза, кунжута и османтуса и др., на наш взгляд, являются малопригодными для промышленного использования, хотя возможно их использование в технологии крафтовых продуктов питания.

Распространенным источником получения меланина служит чага березового гриба. Тем не менее возобновление данного сырья в природных условиях является длительным процессом. Поскольку природные ресурсы некоторых источников меланина, в частности чаги, ограничены, актуальны поиск высокопродуктивных микроорганизмов и разработка способов их культивирования с накоплением высоких концентраций целевого продукта – меланина. Таким образом, микробный синтез меланина с использованием различных микроорганизмов – как прокариотов, так и эукариотов – также имеет хорошие перспективы, доказанные современными исследованиями.

Наиболее перспективным для получения меланинов представляется использование вторичных сырьевых ресурсов, в том числе лузги подсолнечника, что обусловлено значительными объемами ежегодного образования этого сырья, низкой ценой на данный отход (от 0 до 2500 руб/т) и высокой антиоксидантной активностью выделенных меланинсодержащих составов [3]. В то же время получение меланинов из лузги подсолнечника характеризуется рядом недостатков, в частности высокими энергетическими затратами, что является экономически нецелесообразным для выде-

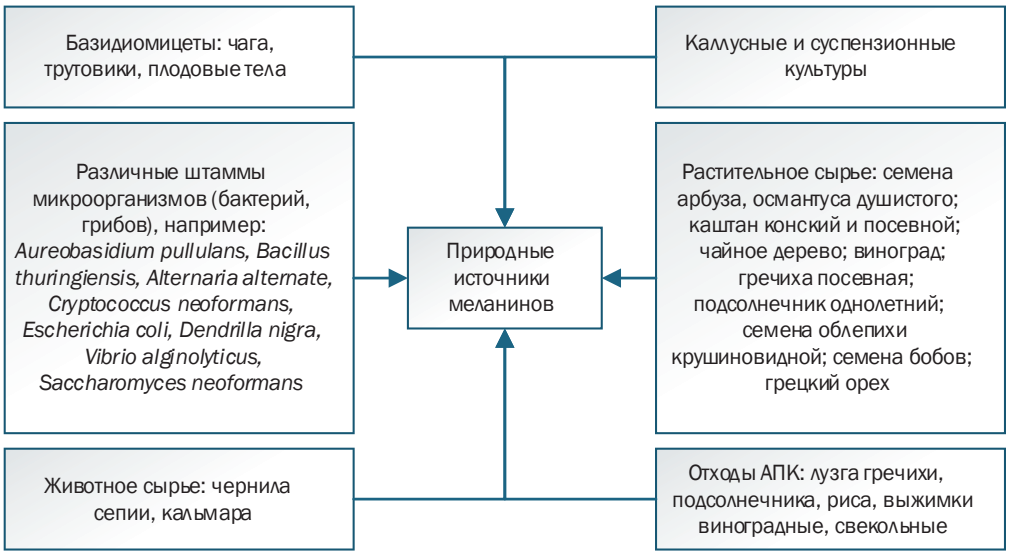


Рис. 1. Природные источники получения меланинов [2]

Fig. 1. Natural sources of melanin production [2]

ления целевого продукта, а также получением при этом жидкой формы продукта, что обусловливает трудности при хранении и транспортировке. Недостатком получения меланина из выжимок свеклы является низкий процент его выхода. Вышесказанное позволяет рассматривать в качестве перспективного источника меланина лузгу гречихи посевной.

Лузга гречихи является крупнотоннажным отходом, получаемым при производстве гречневой крупы. Согласно данным управления Алтайского каря по пищевой и перерабатывающей промышленности, в 2023 г. объем собранной гречихи составил 929 тыс. т, а лузга гречихи составляет 20–25% от общей массы исходной гречихи (186–232 тыс. т)[1]. Однако, несмотря на объемы произрастания гречихи, ее лузга до сих пор является невостребованным отходом, который не нашел практического применения. Стоит отметить, что клетки лузги гречихи имеют сложную волокнистую структуру, в которой меланиновый пигмент локализован в наружных слоях клеточных стенок. Еще одним достоинством лузги является низкая сырьевая стоимость, что позволяет включить способ получения меланина из лузги гречихи в ряд «наилучших доступных технологий». В соответствии со ст. 28.1 Федерального закона «Об охране окружающей среды»[2] «наилучшие доступные технологии» позволяют расшить экологическую и экономическую эффективность российского производства, таким образом, использование вторичных ресурсов растительного сырья является актуальной и востребованной задачей.

Меланины имеют высокую физиологическую активность и функциональные свойства, чем обусловлено их применение в растениеводстве, в технологии фармацевтических препаратов, пищевых систем, косметических средств. Так, в работе [4] для определения антимикробных свойств образцов меланина, полученных из отходов виноделия, использовались условно-патогенные бактерии, принадлежащие к различным таксономическим группам. Результаты показали, что раствор меланина проявлял бактериостатическую или бактерицидную активность в зависимости от тест-культуры и концентрации меланина. Меланин в концентрации 20 мг/мл снижал общее количество клеток *Bacillus subtilis* G17-89, *Salmonella typhimurium* G38 и *Escherichia coli* K12 примерно на 20%. Меланин в концентрации 40 мг/мл подавлял рост *Bacillus subtilis* G17-89 и *Candida gropengiesseri* 10228 почти на 100%. В случае *Escherichia coli* K12 меланин в концентрации 30 мг/мл оказывал тот же эффект, что и в концентрации 40 мг/мл, и снижение количества клеток происходило примерно на 50%. Самую низкую эффективность меланин показал против *Salmonella typhimurium* G38. Концентрация меланина 30 мг/мл уменьшала рост *Candida bovina 10118* примерно на 80%. Также установлено, что низкие концентрации меланина обладали бактериостатической активностью в отношении грибов родов *Aspergillus fumigatus* 8444, *Aspergillus flavus* 10559, *Cladosporium herbarium* 8270, *Cladosporium elatum* 8192, *Fusarium oxysporum* 12017, *Fusarium solani* 12018, *Mucor hiemalis* 12020, *Mucor plumbeus* 12021, *Penicillium chrysogenum* 8203, *Penicillium expansum* 8281.

Нельзя не отметить, что производство биопленок для упаковки пищевых продуктов, армированных наночастицами меланина, является сегментом рынка, представляющим большой интерес ввиду экологических и социальных проблем, связанных с утилизацией обычных пластиков по окончании срока службы, постепенным истощением ископаемых ресурсов, проблемами устойчивости и высокой производительностью [5].

Консервирующие и защитные свойства меланина от ультрафиолетовых лучей позволяют использовать его как компонент активной упаковки, предотвращающий фотодеградацию, сохраняющий качество упакованных пищевых продуктов и увеличивающий срок их хранения [6]. Ученые Ю.-Дж. Бэнг, С. Шанкар и Дж.-У. Райм в 2020 г. получили упаковочную пленку на основе композитных материалов полипропилена с добавлением меланина и исследовали возможность предотвращения «позеленения» картофеля под действием ультрафиолетового излучения – выработки соланина или картофельного яда, который способен вызывать пищевые отравления [7, 8]. Имеются сведения, что меланин обладает антибактериальными свойствами и может предотвращать развитие нежелательных микроорганизмов. Известны данные по исследованию антибактериальной активности меланина в отношении кишечной палочки и патогенных бактерий пищевого предназначения [9].

В работе [10] ученые создали биоактивную пленку на основе полимолочной кислоты с добавлением меланина, выделенного из *Agaricus bisporus*, и обнаружили, что пленка проявляет мощную антибактериальную активность против *Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas putida* при упаковке пищевых продуктов.

Известны данные о проявляемой антибактериальной активности меланина, выделенного из чернил сепии, в отношении синегнойной палочки (*Pseudomonas* spp.) и грибов актиномицетов [11], а также высокой антибактериальной активности каррагинановых пленок с частицами меланина в отношении пищевых условно-патогенных и патогенных бактерий *Escherichia coli* и *Listeria monocytogenes*. *Кроме того,* значительно улучшены свойства пленок от ультрафиолетового излучения, увеличена термическая стабильность, механическая прочность и упругость пленок [12].

В работе [13] также показана возможность использования меланина, синтезированного выделенными из морской губки *Dendrilla nigra* морскими актинобактериями, в технологии первичной упаковки пищевых продуктов. Авторы подтвердили антибактериальные свойства против пищевых патогенов *Bacillus subtilis* (MTCC 1305), *Bacillus cereus* (MTCC 1307), *Staphylococcus*

[1] Управление Алтайского края по пищевой, перерабатывающей, фармацевтической промышленности и биотехнологиям // Upp.alregn.ru. Режим доступа: https://upp.alregn.ru (дата обращения: 12.02.2025).

[2] Об охране окружающей среды: федер. закон от 10 января 2002 г. № 7-ФЗ (ред. от 8 августа 2024 г.) // Росприроднадзор. Режим доступа: https://rpn.gov.ru/upload/iblock/960/f8krnogh6f3f7zifa4s7t0pneucflurz/Federalnyy-zakon-ot-10_01_2002-N-7_FZ-_red_-ot-08_08_2024_.pdf (дата обращения: 14.05.2025).

aureus (MTCC 2940), *Escherichia coli* (MTCC 739), *Vibrio cholerae* (MTCC 3906), *Vibrio parahaemolyticus* (MTCC 451), *Vibrio vulnificus* (MTCC 1145), *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 2458) и *Salmonella typhi* (MTCC 734), что открывают определенные перспективы применения меланина в промышленности и пищевой упаковке.

Таким образом, исследование эффективности меланина в подавлении роста микроорганизмов, вызывающих порчу пищевых продуктов, показало, что его можно использовать в качестве натурального консерванта в составе потребительской упаковки пищевых продуктов – пленки и покрытия – для предотвращения контаминации пищевых продуктов и продления сроков их хранения.

В то же время сведений о проявляемой антибактериальной активности меланина, выделенного из других растительных материалов и отходов агропромышленного комплекса, а также добавлении его как компонента в защитные пленки жиросодержащих/белоксодержащих продуктов не обнаружено. Данная область может быть актуальной для дальнейших исследований.

Молочнокислые продукты, в том числе и сыры, входят в ежедневный рацион большинства людей. Сыр имеет утонченный вкус, богат белками, витаминами, макро- и микроэлементами. В то же время он является продуктом с коротким сроком хранения и представляет собой комфортную среду для размножения бактерий. Микроорганизмы, вызывающие порчу сыра, также могут быть вызваны некачественным сырым молоком. Например, термодурические виды *Bacillus, Clostridium, Lactobacillus, Microbacterium, Micrococcus* и *Streptococcus* способны после пастеризации размножаться в некоторых сырных продуктах, однако к естественной порче сыра относят различные виды плесневелых грибов [14].

В настоящее время с целью придания ровной формы сыра и предотвращения развития патогенной микрофлоры используют восковое покрытие. К достоинствам данного вида покрытия можно отнести легкость нанесения и выполнение своих защитных функций. Недостатками, в свою очередь, является то, что парафиновое покрытие применимо не для всех типов сыров, к тому же при нарушении технологии нанесения на продукте может развиться плесень. Также при потреблении продукта в пищу парафиновая пленка частично срезается вместе с сыром, так как его поверхность, находящаяся в близком контакте с парафином, становится специфичной по вкусу, запаху и ей свойственно затвердевание. При срезании воскового покрытия сыр снова становится подвержен окислению жиров и порче, а упаковка его в пищевую пленку лишь позволяет избежать подсыхания и «заветривания» продукта, способствуя его микробиологической порче [15].

Стоит отметить, что известен опыт использования бактериального меланина из *Pseudomonas putida* в составе пленок из глицерина и сорбита и изучено их влияние на микробиологическую стойкость и цвет твердого сыра в течение 40 дней. Установлено, что после 40 дней созревания в образце сыра, покрытого пленкой с меланинином, низином и натамицином, обнаружено наименьшее количество микроорганизмов по всем анализируемым микробным параметрам. Однако низин и натамицин, входившие в состав пленки, являются широко известными антибиотиками [16], обладающими самостоятельной бактериостатической и бактерицидной активностью, что не позволяет в полной мере оценить вклад меланина в снижение общей обсемененности образцов.

Целью описанного в данной работе исследования являлось изучение противомикробной активности меланина, выделенного из лузги гречихи, в отношении ряда микроорганизмов, идентифицируемых в составе бактериальной микрофлоры сыров промышленного производства.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оценку противомикробной активности меланина в отношении исследуемых микроорганизмов проводили диско-диффузионным методом по МУК 4.2.1890-041 [17]. В качестве тест-культур были выбраны *Penicillium roqueforti*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus pumilus*, которые являются типичными представителями посторонней микрофлоры сыров и сырных продуктов, а также *Lactobacillus plantarum*. Последняя является составной частью нормальной микрофлоры сыров, однако при возникновении видимой порчи продукта необходимо отследить подавление всех видов микроорганизмов. Свойства тест-культур, использованных в исследовании, приведены в табл. 1.

Чистые культуры исследуемых клеток выращивали на рекомендуемых средах. Перед посевом на плотную питательную среду культуру клеток в условиях стерильного бокса микробиологической петлей переносили на стандартизированную жидкую питательную среду – мясопептонный бульон – и осуществляли культивирование в рекомендуемых условиях с использованием суховоздушного термостата ТС-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия). Далее инокулюм суспензионной культуры клеток в концентрации 0,5 по шкале Макфарланда[3] вносили в чашки Петри на стандартизированную плотную питательную среду – мясопептонный агар – и равномерно распределяли с использованием шпателя Дригальского.

Очищенный меланин из лузги гречихи, полученный по способу, описанному в источнике [18], предварительно

Таблица 1. Свойства тест-культур, применяемых в исследовании

Table. 1. Properties of test cultures used in the study

Свойство	Тестовая культура микроорганизма			
	Penicillium roqueforti (штамм F-1311)	*Bacillus subtilis* (штамм B-12587)	*Bacillus pumilus* (штамм B-7308)	*Lactobacillus plantarum* (штамм B-3242)
Среда для культивирования	Мальт-пептонный агар	Среда Лурия	Мясопептонный агар	Среда MRS
Условия культивирования	27 °C, аэробно	37 °C, аэробно	37 °C, аэробно	27 °C, аэробно

[3] Cockerill F.R., et al. Antimicrobial susceptibility testing methods for aerobically growing bacteria: approved standard. 2012. 12 p.

растворяли в 0,05 М растворе NaOH и диметилсульфоксиде для получения растворов с концентрацией растворенного меланина 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0%. Стерильные диски (диаметр 5 мм) смачивали подготовленными растворами (1 мкл) и размещали на поверхности питательной среды с заранее нанесенными культурами клеток на равном удалении друг от друга

После инокуляции подготовленные засеянные чашки подсушивали в ламинар-боксе в течение 30 мин при комнатной температуре, так как излишняя влага препятствует нормальному ходу эксперимента. Засеянные чашки Петри культивировали при температуре 27±1 °С (для штаммов *Penicillium roqueforti* и *Lactobacillus plantarum*) и 37±1 °С (для штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus pumilus*) течение 24 ч до полного зарастания колоний и производили оценку зоны просветления.

Через сутки на газоне сплошного роста культуры отмечали образование зон подавления роста микроорганизмов в виде прозрачной зоны лизиса вокруг дисков и сравнивали чувствительность культуры микроорганизмов к исследуемым препаратам меланина.

Определение диаметра зон лизиса вокруг дисков осуществляли с использованием штангенциркуля с точностью до 0,5 мм. Все экспериментальные исследования проводили в пяти повторностях, результаты представляли как среднее значение ± стандартное отклонение.

Для оценки влияния меланина на рост *Bacillus subtilis* B-12587 использовали метод острых опытов [19]. В качестве культуральной среды для роста *Bacillus subtilis* B-12587 использовали мясопептонный бульон. В асептических условиях в 50 мл стерильной среды вносили рассчитанное количество меланина и 11 мл клеток тест-штамма (концентрация клеток – 1...5×10^5 КОЕ/мл). Колбы культивировали в термостатируемом шейкере BioSan ES-20 (BioSan, Латвия) при 37 °С и 60 об/мин. Контролем служила суспензия тест-штамма, культивируемая в тех же условиях, но без добавления меланина. Прирост биомассы оценивали по увеличению оптической плотности культуральных сред [20]. Оптическую плотность образцов определяли при 490 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм на спектрофотометре Shimadzu UV1800 (Shimadzu, Япония). Расчет удельной скорости роста проводили традиционным графоаналитическим способом путем обработки экспериментальных данных.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием пакета Statistica 10. Для оценки изменений антимикробной активности использовали трехфакторный дисперсионный анализ (независимые переменные – растворитель, концентрация меланина, штамм тест-культуры), сравнение средних значений осуществляли с использованием теста Тьюки (p < 0,05); сила влияния оценивалась методом Снедекора (p < 0,05).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мелкодисперсный черно-коричневый меланин был получен после предварительной обработки лузги кислотой аммиачной экстракцией из лузги гречихи с дальнейшим его осаждением при pH 2,0. Очистка меланина включала в себя двойное переосаждение меланина-сырца. Результаты измерений образовавшихся зон просветления микробиального газона вокруг дисков, смоченных растворами меланина, представлены в таблице 2.

Трехфакторный дисперсионный анализ данных, представленных в табл. 2, показывает, что основным фактором, влияющим на антимикробную активность меланина в изучаемых условиях, является концентрация меланина (сила влияния фактора – 64,5%), вторым по значимости

Таблица 2. Результаты определения зон лизиса в условиях контролируемого эксперимента

Table. 2. Results of determination of lysis zones under controlled experimental conditions

Растворитель	Концентрация меланина, %	Диаметр зоны просветления (мм)			
		Penicillium roqueforti (штамм F-1311)	*Bacillus subtilis* (штамм B-12587)	*Bacillus pumilus* (штамм B-7308)	*Lactobacillus plantarum* (штамм B-3242)
–	Отрицательный контроль – вода	Отсутствуют зоны лизиса			
Серия А (0,05 н NaOH)	Положительный контроль – 0,05 н NaOH	Отсутствуют зоны лизиса			
	0,1 (образцы 1–4)	6,0±0,2	8,7±0,1	2,9±0,1	3,8±0,2
	0,5 (образцы 5–8)	11,4±0,2[32]	15,5±0,2	6,7±0,2[21]	8,1±0,2[28]
	1,0 (образцы 9–12)	14,9±0,1[15]	18,5±0,2[19,40]	9,9±0,1	10,4±0,1[22]
	1,5 (образцы 13–16)	17,4±0,1[26]	22,7±0,2[37]	14,7±0,2[9]	12,6±0,1
	2,0 (образцы 17–20)	20,5±0,2	26,4±0,2	18,4±0,1[20,40]	16,7±0,2[29,35]
Серия Б (диметилсульфоксид)	Положительный контроль – диметилсульфоксид	Отсутствуют зоны лизиса			
	0,1 (образцы 21–24)	7,0±0,2[7]	10,5±0,2[12,31]	3,4±0,1	4,7±0,2
	0,5 (образцы 25–28)	13,2±0,2	17,6±0,1[13]	8,0±0,2[8]	9,5±0,1
	1,0 (образцы 29–32)	16,6±0,1[30,35]	19,8±0,1[33–39]	10,8±0,2[22]	11,6±0,2[5]
	1,5 (образцы 33–36)	19,6±0,1[30,39]	21,6±0,2	16,4±0,2[20,29]	14,3±0,2
	2,0 (образцы 37–40)	22,5±0,1[14]	23,8±0,2	19,8±0,1[30-33]	18,3±0,1[10,19]

Примечание. Различия средних значений в столбце с разными надстрочными цифрами несущественны (p < 0,05). Надстрочные цифры соответствуют номерам образцов.

фактором являются видовые различия в восприимчивости тестовых культур к меланину как антимикробному агенту (сила влияния фактора – 31,5%). Природа растворителя влияет незначительно (сила влияния фактора не превышает 3,2%). Сила возможных совместных взаимодействий изучаемых факторов составляет от 0,1 до 0,4%, что можно считать незначительным воздействием на проявление антимикробной активности меланина.

Представленные в табл. 2 данные позволяют сделать выводы о том, что исследуемый меланин из лузги гречихи проявляет антимикробную активность в отношении всех исследуемых тест-культур. При использовании в качестве растворителя диметилсульфоксида наблюдается незначительное увеличение антимикробной активности во всех вариантах опыта. Можно предположить, что слабощелочные растворы меланина проявляют меньшую антимикробную активность за счет внутримолекулярного взаимодействия гидроксильных групп меланина с растворителем NaOH, что приводит к образованию промежуточных соединений, отличающихся от исходного меланина. Использование диметилсульфоксида в качестве растворителя меланина исключает возникновение подобных взаимодействий, вследствие чего можно наблюдать антимикробную активность именно меланина.

Экспериментальные данные позволяют говорить о большей эффективности использования меланина в качестве антимикробного агента в отношении грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* B-12587 и рокфорового пенициллa *Penicillium roqueforti* F-1311. Наименьшая антимикробная эффективность меланина отмечена в отношении грамположительных бактерий *Bacillus pumilus* B-7308 и *Lactobacillus plantarum* B-3242.

На следующем этапе исследования изучали ингибирующее действие меланина на бактерии *Bacillus subtilis* B-12587 методом острых опытов. На рис. 2 представлена динамика оптической плотности суспензии *Bacillus subtilis* B-12587 при периодическом культивировании в течение 18 ч в зависимости от количества меланина в питательной среде. Увеличение концентрации меланина в составе питательной среды приводит к снижению удельной скорости роста клеток *Bacillus subtilis* B-12587 ($p < 0{,}01$) (рис. 3).

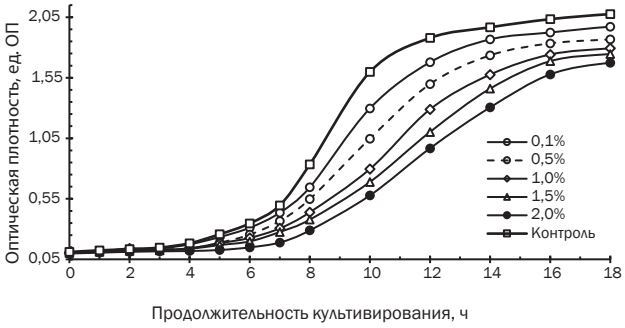


Рис. 2. Динамика оптической плотности суспензии *Bacillus subtilis* B-12587 при периодическом культивировании в зависимости от концентрации меланина

Fig. 2. Dynamics of optical density of *Bacillus subtilis* B-12587 suspension during periodic cultivation depending on melanin concentration

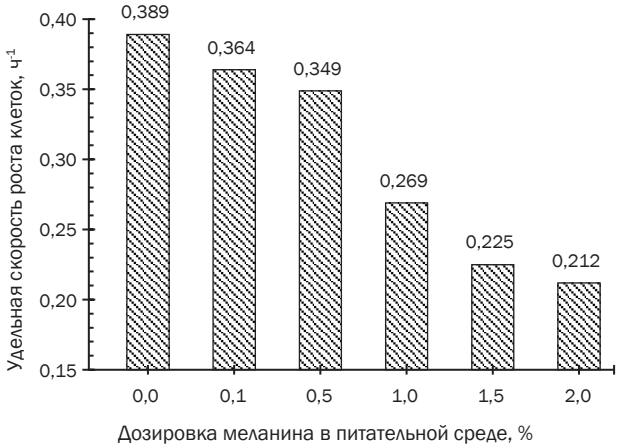


Рис. 3. Динамика удельной скорости роста клеток *Bacillus subtilis* B-12587 в зависимости от дозировки меланина в питательной среде

Fig. 3. Dynamics of the specific growth rate of *Bacillus subtilis* B-12587 cells depending on the dosage of melanin in the nutrient medium

В целом данные по антимикробной активности меланина, выделенного из крупнотоннажного отхода агропромышленного комплекса – лузги гречихи, демонстрируют эффективное подавление развития микрофлоры в присутствии меланина. Так, снижение удельной скорости роста клеток *Bacillus subtilis* B-12587 пропорционально увеличению концентрации меланина в среде (коэффициент корреляции $r = 0{,}97$).

Приведенные данные подтверждают факт того, что исследование использования растительных меланинов в качестве противомикробных агентов в составе пищевых пленок для первичной упаковки продуктов питания являются перспективными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлена антимикробная активность меланина из лузги гречихи в отношении грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* B-12587 и рокфорового пенициллa *Penicillium roqueforti* F-1311. Установлено, что в максимальной исследуемой концентрации зона лизиса при культивировании клеток *Bacillus subtilis* B-12587 составляет 26,4±0,2 мм ($p < 0{,}01$), что в 1,28 раза больше зоны лизиса клеток *Penicillium roqueforti* F-1311, в 1,43 раза больше зоны лизиса клеток *Bacillus pumilus* B-7308 и в 1,58 раза больше зоны лизиса клеток *Lactobacillus plantarum* B-3242. Показано, что при использовании в качестве растворителя диметилсульфоксида наблюдается незначительное увеличение антимикробной активности во всех вариантах опыта ($p < 0{,}01$). По нашему предположению слабощелочные растворы меланина проявляют меньшую антимикробную активность за счет внутримолекулярного взаимодействия гидроксильных групп меланина с растворителем NaOH, что приводит к образованию промежуточных соединений, использование диметилсульфоксида в качестве растворителя меланина исключает возникновение подобных взаимодействий, вследствие чего можно наблюдать антимикробную активность именно меланина.

В эксперименте показано, что существует высокая корреляционная связь (r = 0,97) между концентрацией меланина в среде и подавлением роста клеток *Bacillus subtilis* B-1258. Полученные в работе данные свидетельствуют о перспективности исследований по использованию растительных меланинов в качестве противомикробных агентов в составе пищевых пленок для первичной упаковки продуктов питания.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Кадрицкая Е.А., Школьникова М.Н. Применение меланина в пищевой промышленности // Аграрно-пищевые инновации. 2022. № 3. С. 69–76. DOI: 10.31208/2618-7353-2022-19-69-76. EDN: TKHXRP.

2. Mostert A.B. Melanin, the what, the why and the how: An introductory review for materials scientists interested in flexible and versatile polymers // Polymers. 2021. Vol. 13, no. 10. P. 1670. DOI: 10.3390/polym13101670.

3. Lomovskiy I., Kiryanov A., Skripkina T. The effect of reverse sorption on an extraction kinetics melanin case // Processes. 2023. Vol. 11, no. 11. P. 3192. DOI: 10.3390/pr11113192.

4. Minasyan E., Aghajanyan A., Karapetyan K., Khachaturyan N., Hovhannisyan G., Yeghyan K., et al. Antimicrobial activity of melanin isolated from wine waste // Indian Journal of Microbiology. 2024. Vol. 64. P. 1528–1534. DOI: 10.1007/s12088-023-01155-9.

5. Tsouko E., Tolia E., Sarris D. Microbial melanin: renewable feedstock and emerging applications in food-related systems // Sustainability. 2023. Vol. 15, no. 9. P. 7516. DOI: 10.3390/su15097516.

6. Yang M., Li L., Yu S., Liu J., Shi J. High performance of alginate/polyvinyl alcohol composite film based on natural original melanin nanoparticles used as food thermal insulating and UV-vis block // Carbohydrate Polymer. 2020. Vol. 233. P. 115884. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.115884.

7. Bang Y.-J., Shankar S., Rhim J.-W. Preparation of polypropylene/poly (butylene adipate-co-terephthalate) composite films incorporated with melanin for prevention of greening of potatoes // Packaging Technology and Science. 2020. Vol. 33, no. 10. P. 433–441. DOI: 10.1002/pts.2525.

8. Łopusiewicz L., Drozlowska E., Trocer P., Kostek M., Śliwiński M., Henriques M.H.F., et al. Whey protein concentrate/isolate biofunctional films modified with melanin from watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds // Materials. 2020. Vol. 13, no. 17. P. 3876. DOI: 10.3390/ma13173876.

9. Liang Y., Zhao Y., Sun H., Dan J., Kang Y., Zhang Q., et al. Natural melanin nanoparticle-based photothermal film for edible antibacterial food packaging // Food Chemistry. 2023. Vol. 401. P. 134117. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134117.

10. Łopusiewicz Ł., Jędra F., Mizielińska M. New poly(-lactic acid) active packaging composite films incorporated with fungal melanin // Polymers. 2018. Vol. 10, no. 4. P. 386. DOI: 10.3390/polym10040386.

11. Roy S., Rhim J.-W. Preparation of carrageenan-based functional nanocomposite films incorporated with melanin nanoparticles // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2019. Vol. 176. P. 317–324. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.01.023.

12. Roy S., Shankar S., Rhim J.-W. Melanin-mediated synthesis of silver nanoparticle and its use for the preparation of carrageenan-based antibacterial films // Food Hydrocolloids. 2019. Vol. 88. P. 237–246. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.10.013.

13. Kiran G.S., Dhasayan A., Lipton A.N., Selvin J., Arasu M.V., Al-Dhabi N.A. Melanin-templated rapid synthesis of silver nanostructures // Journal of Nanobiotechnology. 2014. Vol. 12, no. 1. P. 18. DOI: 10.1186/1477-3155-12-18.

14. Galaby S.S., Maharik N.M.S., Khalifa M.I. Prevalence of some deteriorating microorganisms in raw milk and some locally made cheese // New Valley Veterinary Journal. 2021. Vol. 1, no. 2. P. 21–27. DOI: 10.21608/nvvj.2021.205838.

15. Ibrahim R.A., El-Salam B.A.A., Alsulami T., Ali H.S., Hoppe K., Badr A.N. Neoteric biofilms applied to enhance the safety characteristics of Ras cheese during ripening // Foods. 2023. Vol. 12, no. 19. P. 3548. DOI: 10.3390/foods12193548.

16. Ferraz A.R., Goulão M., Santo C.E., Anjos O., Serralheiro M.L., Pintado C.M.B.S. Novel, edible melanin-protein-based bioactive films for cheeses: antimicrobial, mechanical and chemical characteristics // Foods. 2023. Vol. 12, no. 9. P. 1806. DOI: 10.3390/foods12091806.

17. Школьникова М.Н., Аверьянова Е.В., Рожнов Е.Д., Баташов Е.С. Исследование антибактериальной активности флавоноидов облепихового шрота // Индустрия питания. 2020. Т. 5. N 3. С. 61–69. DOI: 10.29141/2500-1922-2020-5-3-7. EDN: AWZINX.

18. Пат. № 2780731, Российская Федерация, МПК C09B 61/00. Способ выделения меланина из лузги гречихи / Я.В. Уразова, Е.Д. Рожнов, Л.А. Бахолдина, Е.А. Кадрицкая, М.Б. Ребезов, М.А. Шариати. Заявл. 02.06.2021; опубл. 29.09.2022. Бюл. № 28.

19. Zhang Z., Yang Y., Xi H., Yu Y., Song Y., Wu C., et al. Evaluation methods of inhibition to microorganisms in biotreatment processes: a review // Water Cycle. 2023. Vol. 4. P. 70–78. DOI: 10.1016/j.watcyc.2023.02.004.

20. Nielsen S.L., Hansen B.W. Evaluation of the robustness of optical density as a tool for estimation of biomass in microalgal cultivation: The effects of growth conditions and physiological state // Aquaculture Research. 2019. Vol. 50, no 9. P. 2698–2706. DOI: 10.1111/are.14227.

REFERENCES

1. Kadritskaya E.A., Shkolnikova M.N. The use of melanin in the food industry. *Agrarian-and-food innovations*. 2022;3:44-51. (In Russian). DOI: 10.31208/2618-7353-2022-19-69-76. EDN: TKHXRP.

2. Mostert A.B. Melanin, the what, the why and the how: An introductory review for materials scientists interested in flexible and versatile polymers. *Polymers*. 2021;13(10):1670. DOI: 10.3390/polym13101670.

3. Lomovskiy I., Kiryanov A., Skripkina T. The effect of reverse sorption on an extraction kinetics melanin case. *Processes*. 2023;11(11):3192. DOI: 10.3390/pr11113192.

4. Minasyan E., Aghajanyan A., Karapetyan K., Khachaturyan N., Hovhannisyan G., Yeghyan K., et al. Antimicrobial activity of melanin isolated from wine waste. *Indian Journal of Microbiology*. 2024;64:1528-1534. DOI: 10.1007/s12088-023-01155-9.

5. Tsouko E., Tolia E., Sarris D. Microbial melanin: renewable feedstock and emerging applications in food-related systems. *Sustainability*. 2023;15(9):7516. DOI: 10.3390/su15097516.

6. Yang M., Li L., Yu S., Liu J., Shi J. High performance of alginate/polyvinyl alcohol composite film based on natural original melanin nanoparticles used as food thermal insulating and UV-vis block. *Carbohydrate Polymer*. 2020;233:115884. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.115884.

7. Bang Y.-J., Shankar S., Rhim J.-W. Preparation of polypropylene/poly (butylene adipate-co-terephthalate) composite films incorporated with melanin for prevention of greening of potatoes. *Packaging Technology and Science*. 2020;33(10):433-441. DOI: 10.1002/pts.2525.

8. Łopusiewicz L., Drozlowska E., Trocer P., Kostek M., Śliwiński M., Henriques M.H.F., et al. Whey protein concentrate/isolate biofunctional films modified with melanin from watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds. *Materials*. 2020;13(17):3876. DOI: 10.3390/ma13173876.

9. Liang Y., Zhao Y., Sun H., Dan J., Kang Y., Zhang Q., et al. Natural melanin nanoparticle-based photothermal film for edible antibacterial food packaging. *Food Chemistry*. 2023;401:134117. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134117.

10. Łopusiewicz Ł., Jędra F., Mizielińska M. New poly(-lactic acid) active packaging composite films incorporated with fungal melanin. *Polymers*. 2018;10(4):386. DOI: 10.3390/polym10040386.

11. Roy S., Rhim J.-W. Preparation of carrageenan-based functional nanocomposite films incorporated with melanin nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;176:317-324. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.01.023.

12. Roy S., Shankar S., Rhim J.-W. Melanin-mediated synthesis of silver nanoparticle and its use for the preparation of carrageenan-based antibacterial films. *Food Hydrocolloids*. 2019;88:237-246. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.10.013.

13. Kiran G.S., Dhasayan A., Lipton A.N., Selvin J., Arasu M.V., Al-Dhabi N.A. Melanin-templated rapid synthesis of silver nanostructures. *Journal of Nanobiotechnology*. 2014;12(1):18. DOI: 10.1186/1477-3155-12-18.

14. Galaby S.S., Maharik N.M.S., Khalifa M.I. Prevalence of some deteriorating microorganisms in raw milk and some locally made cheese. *New Valley Veterinary Journal*. 2021;1(2):21-27. DOI: 10.21608/nvvj.2021.205838.

15. Ibrahim R.A., El-Salam B.A.A., Alsulami T., Ali H.S., Hoppe K., Badr A.N. Neoteric biofilms applied to enhance the safety characteristics of Ras cheese during ripening. *Foods*. 2023;12(19):3548. DOI: 10.3390/foods12193548.

16. Ferraz A.R., Goulão M., Santo C.E., Anjos O., Serralheiro M.L., Pintado C.M.B.S. Novel, edible melanin-protein-based bioactive films for cheeses: antimicrobial, mechanical and chemical characteristics. *Foods*. 2023;12(9):1806. DOI: 10.3390/foods12091806.

17. Shkolnikova M.N., Averyanova E.V., Rozhnov E.D., Batashov E.S. Antibacterial activity research of sea buckthorn meal flavonoids. *Food Industry*. 2020;5(3):61-69. (In Russian). DOI: 10.29141/2500-1922-2020-5-3-7. EDN: AWZINX.

18. Urazova Y.V., Rozhnov E.D., Bakholdina L.A., Kadritskaya El.A., Rebezov M.B., Shariati M.A. *Method for isolating melanin from buckwheat husks*. Patent RF, no. 2780731; 2022 (In Russian).

19. Zhang Z., Yang Y., Xi H., Yu Y., Song Y., Wu C., et al. Evaluation methods of inhibition to microorganisms in biotreatment processes: a review. *Water Cycle*. 2023;4:70-78. DOI: 10.1016/j.watcyc.2023.02.004.

20. Nielsen S.L., Hansen B.W. Evaluation of the robustness of optical density as a tool for estimation of biomass in microalgal cultivation: The effects of growth conditions and physiological state. *Aquaculture Research*. 2019;50(9):2698-2706. DOI: 10.1111/are.14227.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Уразова Яна Валерьевна,
старший преподаватель,
Бийский технологический институт (филиал)
Алтайского государственного технического
университета им. И.И. Ползунова,
659305, г. Бийск, ул. Героя Советского Союза
Трофимова, 27, Российская Федерация,
urazova.iav@bti.secna.ru
https://orcid.org/0000-0002-6847-8487

Рожнов Евгений Дмитриевич,
д.т.н., профессор,
Уральский государственный
экономический университет,
620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта /
Народной Воли, 62/45, Российская Федерация,
✉ red@bti.secna.ru
https://orcid.org/0000-0002-3982-9700

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yana V. Urazova,
Senior Lecturer,
Biysk Technological Institute (branch)
of the Altai State Technical University,
27, Geroi Sovetskogo Soyuza Trofimov St.,
Biysk, 659305, Russian Federation,
urazova.iav@bti.secna.ru
https://orcid.org/0000-0002-6847-8487

Evgeny D. Rozhnov,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Ural State University of Economics,
62/45, 8 Marta / Narodnoi Voli St.,
620144, Yekaterinburg, Russian Federation,
✉ red@bti.secna.ru
https://orcid.org/0000-0002-3982-9700

Школьникова Марина Николаевна,
д.т.н., доцент, профессор,
Уральский государственный
экономический университет,
620144, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта /
Народной Воли, 62/45, Российская Федерация,
shkolnikova.m.n@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-9146-6951

Marina N. Shkolnikova,
Dr. Sci. (Engineering),
Associate Professor, Professor,
Ural State University of Economics,
62/45, 8 Marta / Narodnoi Voli St.,
620144, Yekaterinburg, Russian Federation,
shkolnikova.m.n@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-9146-6951

Вклад авторов

Я.В. Уразова – проведение исследования, написание черновика рукописи.
Е.Д. Рожнов – разработка концепции, формальный анализ, визуализация, редактирование рукописи.
М.Н. Школьникова – разработка методологии, административное руководство исследовательским проектом, валидация результатов.

Contribution of the authors

Yana V. Urazova – investigation, writing – original draft.
Evgeny D. Rozhnov – conceptualization, formal analysis, visualization, editing.
Marina N. Shkolnikova – methodology, project administration, validation.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

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 04.12.2024.
Одобрена после рецензирования 11.02.2025.
Принята к публикации 31.05.2025.

Information about the article

The article was submitted 04.12.2024.
Approved after reviewing 11.02.2025.
Accepted for publication 31.05.2025.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 581.192.2:581.522.4
EDN: MVUYYR
DOI: 10.21285/achb.975

Влияние *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* на уровень эндогенного пероксида водорода и активность пероксидазы в трансгенных растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.), экспрессирующих ген *gox*

Н.В. Филинова, А.А. Ищенко, Т.В. Копытина✉, Л.Е. Макарова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. *Возрастание уровня пероксида водорода (H_2O_2) в растительных тканях способствует повышению устойчивости к разнообразным биотическим и абиотическим стрессорам. Одним из основных ферментов, участвующих в регуляции уровня H_2O_2 у растений, является пероксидаза. Цель данной работы заключалась в исследовании уровня эндогенного H_2O_2, активности пероксидазы и ее изоферментного спектра в корнях картофеля in vitro сорта Скарб и его трансгенных линий, экспрессирующих ген глюкозооксидазы (gox) из Penicillium funiculosum в нормальных условиях и при взаимодействии с фитопатогеном Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus. Показано, что уровень H_2O_2 трансгенных линий, несущих модифицированный ген gox, был существенно выше в сравнении с исходным сортом и еще более возрастал при воздействии фитопатогена. В нормальных условиях роста выявлены различия в спектре изоформ пероксидазы в трансгенных линиях и исходном сорте Скарб. При контакте с фитопатогеном существенно изменялся спектр изоформ в исходном сорте Скарб и в трансгенных линиях в сравнении с сортом Скарб. Полученные данные доказывают, что продукт экспрессии гена gox формирует высокий уровень H_2O_2 в результате окисления глюкозы. Высокий уровень H_2O_2 в трансгенных линиях, вероятно, инактивирует пероксидазу. Показано, что заражение растений фитопатогеном Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus приводит к увеличению активности пероксидазы и изменению изоферментного состава как в контроле, так и в трансгенных линиях.*

Ключевые слова: *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus, трансгенные растения картофеля, глюкозооксидаза, пероксид водорода, пероксидаза, изоферментный спектр*

Благодарности. *Авторы выражают благодарность докторам биологических наук Д.В. Савчину, О.Ю. Урбанович (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь), а также доктору биологических наук Г.Б. Боровскому (Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия) за предоставленные трансгенные растения.*

Финансирование. *Исследование выполнено в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (рег. № НИОКТР-125021902466-4).*

Для цитирования: Филинова Н.В., Ищенко А.А., Копытина Т.В., Макарова Л.Е. Влияние *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* на уровень эндогенного пероксида водорода и активность пероксидазы в трансгенных растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.), экспрессирующих ген *gox* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 243–251. DOI: 10.21285/achb.975. EDN: MVUYYR.

© Филинова Н.В., Ищенко А.А., Копытина Т.В., Макарова Л.Е., 2025

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Effect of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* on endogenous hydrogen peroxide levels and peroxidase activity in transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) expressing the *gox* gene

Nadezhda V. Filinova, Aleksei A. Ishchenko, Tatyana V. Kopytina✉, Liudmila E. Makarova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. *Higher levels of hydrogen peroxide (H_2O_2) in plant tissues improve resistance to a variety of biotic and abiotic stressors. One of the key enzymes involved in the regulation of H_2O_2 levels in plants is peroxidase. The present study was aimed at analyzing the level of endogenous H_2O_2, peroxidase activity, and its isoenzyme spectrum in the roots of in vitro Skarb cultivar and its transgenic lines expressing the Penicillium funiculosum glucose oxidase (gox) gene under normal conditions and with exposure to the phytopathogen Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus. The H_2O_2 level of transgenic lines carrying the modified gox gene was shown to be significantly higher compared to the original cultivar and to increase further due to exposure to the phytopathogen. Under normal growth conditions, differences were observed in the spectrum of peroxidase isoforms in the transgenic lines and the original Skarb cultivar. Upon exposure to the phytopathogen, the spectrum of isoforms was significantly altered in the original Skarb cultivar and in the transgenic lines compared with the Skarb cultivar. The obtained data prove that the product of gox gene expression causes a high H_2O_2 level due to glucose oxidation. High H_2O_2 levels in transgenic lines presumably inactivate peroxidase. Exposure to the phytopathogen Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus is shown to increase peroxidase activity and change the isoenzyme composition in both control and transgenic lines.*

Keywords: *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus, transgenic potato plants, glucose oxidase, hydrogen peroxide, peroxidase, isoenzyme spectrum*

Acknowledgements. *The authors are grateful to Dr. Sci. D.V. Savchin, Dr. Sci. O.Yu. Urbanovich (Institute of Genetics and Citilogy of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus) and to Dr. Sci. G.B. Borovski (Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia) for the provided transgenic plants.*

Funding. *The study was carried out within the framework of the state assignment of the Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (project no. 125021902466-4).*

For citation: Filinova N.V., Ishchenko A.A., Kopytina T.V., Makarova L.E. Effect of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* on endogenous hydrogen peroxide levels and peroxidase activity in transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) expressing the *gox* gene. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2): 243-251. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.975. EDN: MVUYYR.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных прикладных направлений физиологии растений является получение культурных растений, устойчивых к неблагоприятным условиям среды и фитопатогенам. Наряду с традиционными методами, широко используются генно-инженерные подходы, с помощью которых ученные наделяют растения новыми полезными признаками, коих невозможно добиться путем селекционных методов. Кроме того, трансгенные растения можно использовать в качестве модельных систем для решения различных фундаментальных задач. Одной из таких задач является повышение защитных свойств растений путем привнесения генов, кодирующих белки, способные проявлять защитные функции. Примером подобных растений могут служить используемые в данной работе растения картофеля, экспрессирующие ген *gox* из грибов *Penicillium funiculosum* [1].

Ген *gox* кодирует фермент глюкозооксидазу (*β-D*-глюкоза: O_2-1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4), которая катализирует реакцию окисления *β-D*-глюкозы до *β-D*-глюконо-*δ*-лактона и сопряженное восстановление O_2 до H_2O_2. По мнению авторов генетических конструкций, наличие лидерной последовательности секреции в апопласт позволяет белку секретироваться в апопласт и способствовать накоплению H_2O_2 именно в этом компартменте [1, 2].

Известно, что высокий уровень H_2O_2 в растительных тканях способствует повышению устойчивости к разнообразным биотическим [3] и абиотическим стрессорам [4]. Одним из основных ферментов, участвующих в регуляции уровня H_2O_2 у растений, является пероксидаза. В зависимости от вида стресса изменяется ее изоферментный спектр [5, 6].

Активность пероксидазы коррелирует с устойчивостью сортов сельскохозяйственных растений (активность пероксидазы в клетках сортов, устойчивых к патогенам, в два и более раза выше, чем в восприимчивых), а разнообразие ее изоферментного состава расширяет границы функционирования (активность в широком диапазоне pH от 3 до 14), что является приспособительным механизмом. В проведенных ранее исследованиях на нетрансгенных сортах картофеля *in vitro* показано влияние заражения *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) на изоферментный состав слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы. Было установлено, что инфицирование растений патогеном приводит к быстрой активации пероксидазы, к появлению новых изоформ и исчезновению некоторых других изоформ фермента [6].

Виду всего вышесказанного настоящая работа посвящена изучению связи между уровнем H_2O_2, активностью пероксидазы и спектра ее изоформ в растениях картофеля *in vitro*, трансформированных геном *gox*, в обычных условиях роста и при заражении *Cms*. Поскольку при заражении растений первоначально с фитопатогеном контактируют именно корни, а не стебли и листья, на данном этапе исследований интерес представляла оценка изучаемых параметров именно в корнях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Скарб белорусской селекции и три трансгенные линии данного сорта, полученные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси (г. Минск, Республика Беларусь): линия L 17.2 – растения, трансформированные нативным геном глюкозооксидазы *gox* из *Penicillium funiculosum*, линия M 7.3 – растения, трансформированные модифицированным геном *gox-mod*, и линия Pb 14.10 – растения, трансформированные вектором без целевого гена.

Растения культивировали *in vitro* в течение 7 сут. на твердой питательной среде Мурасиге – Скуга (Sigma, США) с добавлением 20 г/л сахарозы (АО «ЛенРеактив», Россия) и 5 г/л агар-агара (ООО «Биотехинновация», Россия) (pH 5,8–6,0) до образования первых корней. Затем переносили на жидкую питательную среду, где их культивировали до инокуляции в течение 4 сут. Рост растений проходил в факторостатных условиях при температуре 21 °C и 16-часовом фотопериоде.

Бактериальный патоген, вызывающий кольцевую гниль картофеля (*Cms*, штамм 6889 (вирулентный, мукоидный)), выращивали на жидкой среде, содержащей 10 г/л дрожжевого экстракта (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия), 15 г/л глюкозы (АО «ЛенРеактив», Россия) (pH 7,0) в течение 3 сут. Титр бактерий определяли при 655 нм на планшетном спектрофотометре Immunochem-2100 (High Technology Inc., США).

Растения, помещенные на жидкую питательную среду, заражали планктонной культурой бактерий в стерильных условиях через пластиковую трубочку, чтобы бактерии попали исключительно в среду роста, а не на листья растений. При инфицировании конечный титр составлял 2×10^7 клеток/мл. Совместное культивирование проводили в вышеописанных условиях в течение 24 ч. Для исследований использовали корни незараженных растений картофеля, взятых в нулевой точке перед инфицированием (исходные растения), через 24 ч и 10 сут. от начала взаимодействия с патогеном.

Для выделения «растворимых» пероксидаз навеску растительного образца растирали с 0,1 М натрий-фосфатным буфером (pH 7,0) с добавлением 10 мМ фенилметилсульфонилфторида (Sigma, США) на льду. Полученный гомогенат центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин. Для определения пероксидазной активности использовали супернатант.

Активность пероксидазы определяли по скорости окисления *o*-дианизидина в присутствии пероксида водорода и пероксидазы в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). После внесения в реакционную смесь 0,1 мл 16 мМ перекиси водорода в течение 120 с проводили посекундное измерение оптической плотности при 460 нм на спектрофотометре (Unico, США). Контрольная среда содержала: 2,4 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера (pH 7,0), 0,1 мл 4,3 мМ *o*-дианизидина и 0,5 мл экстракта. Активность фермента рассчитывали в условных единицах на 1 г сырой массы, для оценки удельной активности – на 1 мг белка [7–9].

Содержание белка в пробах определяли по методу Бредфорда [10].

Содержание перекиси водорода определяли с использованием хлорида титана, основываясь на методике из работы [11].

Выявление изоформ пероксидазы осуществляли с помощью нативного электрофореза в 10%-м полиакриламидном геле (ПААГ) [12]. Для обнаружения ферментативной активности в ПААГ использовали диаминобензидиновый метод в модификации Лойда и др. [13].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel. В таблице и на рисунках указаны средние арифметические значения и их стандартные отклонения. Все эксперименты проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нативный ген *gox* клонирован из высокоактивного грибного штамма *Penicillium funiculosum* 46.1. Модифицированный ген *gox-mod* (M 7.3) представляет собой ген *gox* с замененными кодонами на синонимичные кодоны растений *Solanum tuberosum L.*, что, по данным белорусских коллег, ведет к увеличению концентрации эндогенного H_2O_2 в среднем на 23% по сравнению с трансгенными растениями, которые экспрессируют нативный ген в варианте L 17.2 [1, 2].

В первую очередь в растениях исходного сорта и его трансгенных линиях анализировали уровень H_2O_2, чтобы удостовериться в том, что трансгенные растения действительно обладают высоким уровнем H_2O_2 в результате экспрессии гена *gox* (рис. 1).

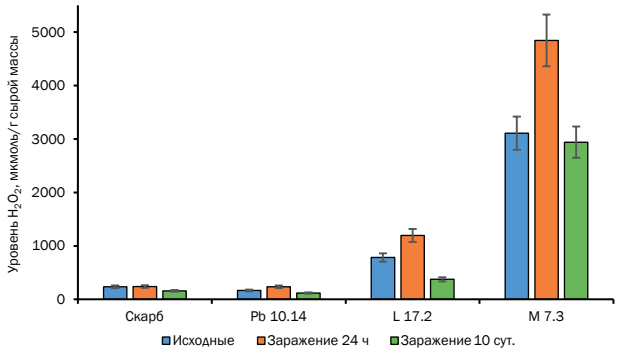


Рис. 1. Уровень перекиси водорода у растений картофеля сорта Скарб и его трансгенных линий до инфицирования (исходные растения), а также через 24 ч и 10 сут. после инфицирования бактериями *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Fig. 1. H_2O_2 level in the control and transgenic lines of potato variety Skarb before infection (source plants) and 24 hours and 10 days after infection with bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Анализ уровня H_2O_2 в корнях незараженных растений картофеля показал, что его содержание у растений трансгенной линии Pb 14.10, модифицированных пустым вектором, на 30% ниже, чем у исходного сорта. В то же время присутствие в геноме растений гена *gox* L 17.2 и *gox-mod* M 7.3 приводило к существенному увеличению уровня H_2O_2 на 230 и 1211% соответственно (см. рис. 1). Накопление большого количества H_2O_2 является результатом экспрессии привнесенного гена *gox*, как и задумывалось авторами трансгенных линий при их создании [1].

Спустя 24 ч контакта с фитопатогеном *Cms* мы отмечали увеличение уровня H_2O_2 в растениях линий L 17.2 и M 7.3, в то время как в растениях исходной линии уровень H_2O_2 оставался на прежнем уровне, в растениях линии Pb 10.14 он увеличивался незначительно. По истечении 10 сут. воздействия фитопатогена отмечалось снижение уровня H_2O_2 во всех исследуемых линиях, причем во всех линиях уровень H_2O_2 был ниже исходных значений. Вероятно, это было связано с развитием системного ответа на стресс, активацией антиоксидантных ферментов и других защитных механизмов, что приводило к снижению уровня H_2O_2. В то же время трансгенные линии, экспрессирующие ген *gox*, сохраняли повышенный уровень H_2O_2 в сравнении с исходным сортом Скарб и Pb 14.10.

Эти результаты хорошо сопоставляются с известными данными, полученными на трансгенных растениях картофеля, экспрессирующих ген *funga1*, кодирующий глюкозооксидазу из другого плесневого гриба *Aspergillus niger*, в которых также был выявлен высокий уровень H_2O_2 как в тканях листьев, так и в клубнях растений. Указанные трансгенные растения картофеля демонстрировали высокую устойчивость к бактериальной мягкой гнили (бактериальной водянке), вызываемой *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, и фитофторозу, вызываемому *Phytophthora infestans* [3].

Известно, что само по себе заражение фитопатогеном, как и агробактериальная трансформация, может приводить к появлению различных активных форм кислорода в растениях, включая H_2O_2, что является характерными признаками окислительного стресса [14, 15]. H_2O_2 является наиболее «долгоживущей» формой активных форм кислорода и очень реакционноспособной, роль ее как сигнальной молекулы весьма многообразна: от регуляции гормональной сигнализации и экспрессии генов, участвующих в защите растений от патогенной инфекции [15, 16], активации кальциевых каналов в мембране клеток [17], до регуляции экспрессии хлоропластных и ядерных генов [4, 18], что приводит к изменению активности ферментов, участвующих в утилизации активных форм кислорода, таких как супероксиддисмутаза, каталаза, полифенолоксидаза и пероксидаза [19, 20]. Было показано, что в клетках трансгенных растений риса, синтезирующих гетерологичный пептид цекропин А, даже в отсутствии фитопатогенной инфекции увеличивается экспрессия ряда генов системы защиты от окислительного стресса, при этом наиболее активируемыми являются гены пероксидаз [21].

Далее предстояло оценить зависимость между уровнем H_2O_2 и активностью пероксидазы в корнях исследуемых растений картофеля в нормальных условиях роста и при взаимодействии с патогеном (рис. 2).

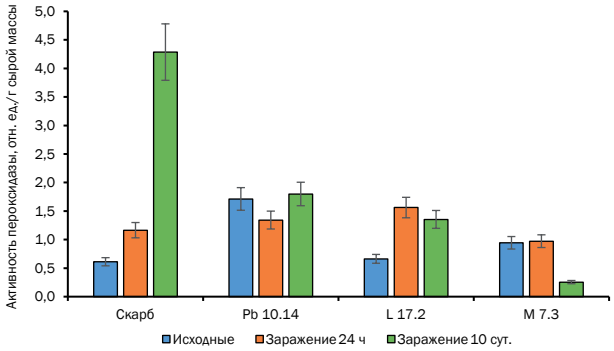


Рис. 2. Активность пероксидазы у растений картофеля сорта Скарб и его трансгенных линий до инфицирования (исходные растения), а также через 24 ч и 10 сут. после инфицирования бактериями *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Fig. 2. Peroxidase activity in control and transgenic lines of potato variety Skarb before infection (source plants) and 24 hours and 10 days after infection with bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Из рис. 2 видно, что в незараженных растениях в сравнении с исходным сортом активность пероксидазы была выше у линий Pb 14.10 (на 222%) и M 7.3 (на 61%). У линии L 17.2 активность фермента осталась на уровне исходного сорта Скарб. Через 24 ч после заражения фитопатогеном у сорта Скарб содержание H_2O_2 осталось на уровне незараженных растений, при этом активность пероксидазы увеличилась на 75% (по сравнению с незараженными растениями). У растений картофеля, модифицированных пустым вектором (Pb 14.10), мы наблюдали 40%-е увеличение содержания H_2O_2 на фоне снижения активности пероксидазы (по сравнению с незараженными растениями). У растений, модифицированных генами *gox*, на фоне существенного увеличения уровня H_2O_2 (порядка 30% для линии L 17.2 и 50% для линии M 7.3) увеличение активности перок-

сидазы наблюдали только у линии L 17.2 на 148%, у линии M 7.3 происходило лишь незначительное увеличение активности пероксидазы (см. рис. 2).

Показано, что через 24 ч и через 10 сут. после заражения фитопатогеном тенденции изменений активности фермента у сорта Скарб и его линий существенно отличались (см. рис. 2). При этом у трансгенных линий L 17.2 и M 7.3 прямой связи изменений активности пероксидазы с начальным уровнем H_2O_2 не выявлено. Высокий уровень H_2O_2 (см. рис. 1), возникающий в результате экспрессии целевого гена *gox* у трансгенных линий, не способствовал увеличению активности пероксидазы как в отсутствии, так и в присутствии инфекционной нагрузки у линии M 7.3. Однако у линии L 17.2 при более низком, чем у линии M 7.3, уровне H_2O_2 заметно увеличивалась активность пероксидазы при контакте с фитопатогеном. У линии Pb 14.10, трансформированной холостым агробактериальным вектором, вероятно, пероксидаза, показатели активности которой были высокими, способствовала поддерживанию низкого уровня H_2O_2 в корнях как у неинфицированных, так и у инфицированных растений (см. рис. 1, 2).

После 10 сут. воздействия фитопатогена наблюдали сильное снижение активности пероксидазы у линии M 7.3, у линии L 17.2 происходило небольшое снижение активности, у линии Pb 14.10 активность пероксидазы вернулась к исходным значениям, а исходный сорт Скарб демонстрировал существенное увеличение активности пероксидазы. Вероятно, у сорта Скарб к 10 сут. развилась защитная реакция на инфицирование фитопатогеном, проявившаяся в повышении активности пероксидазы. Приведенные данные могут свидетельствовать о разных физиологических реакциях генетически неоднородных линий растений картофеля на действие фитопатогена, а также о том, что высокий уровень H_2O_2 не всегда напрямую приводит к увеличению активности пероксидазы ввиду того, что могут активироваться другие антиоксидантные ферменты. Имеются данные о том, что пероксидаза является нестабильным ферментом и легко инактивируется своим окислительным субстратом – H_2O_2, то есть при избытке субстрата происходит самоинактивация фермента [22, 23], что в нашем случае как раз и может объяснять снижение активности пероксидазы в трансгенных линиях с высоким уровнем H_2O_2.

Представлялось интересным проследить, изменяется ли спектр изоформ пероксидазы в корнях растений картофеля в норме и при заражении патогеном. Путем электрофореза в ПААГ были получены профили изоформ фермента, отображенные в таблице.

Результаты электрофореза в ПААГ показали, что изоферментные спектры пероксидазы в незараженных корнях исходного сорта Скарб и во всех его трансгенных линиях отличаются. Так, мы видим, что у всех трансгенных линий до инфицирования выявлена изоформа пероксидазы с Rf 0,40, которая отсутствовала у сорта Скарб, но выявилась после инфицирования *Cms*. Линия M 7.3 отличалась наличием низкомолекулярных форм (Rf 0,68 и 0,72), которые не наблюдали у двух других трансгенных линий и исходного сорта Скарб.

После 24 ч взаимодействия с фитопатогеном наблюдали следующие изменения изоферментного состава в корнях растений картофеля сорта Скарб и во всех трансгенных линиях. Во-первых, во всех вариантах эксперимента изоферментный состав пероксидазы стал почти одинаковым. Во-вторых, поменялся изоферментный состав – появились высокомолекулярные формы (Rf 0,20 и 0,36) и исчезли все изоформы с Rf больше 0,50. За 10 сут. коинкубации с фитопатогеном у сорта Скарб наблюдалось увеличение числа низкомолекулярных изоформ с Rf 0,50 и 0,52, а у линии M 7.3 – изоформ с Rf 0,44, 0,46, 0,50.

Предварительно сделан вывод о том, что не всегда наличие широкого спектра изоформ пероксидазы обеспечивает высокий уровень активности фермента в нормальных условиях роста, а также при контакте с фитопатогеном. Вероятно, у сорта Скарб и у линии M 7.3 больший вклад в увеличение активности вносят низкомолекулярные формы. В пользу сказанного свидетельствуют данные активности пероксидазы в корнях растений линии M 7.3 до контакта с фитопатогеном и сорта Скарб после 10 сут. контакта с фитопатогеном (см. рис. 2). Возможно, отсутствие низкомолекулярных

Относительная подвижность изоформ пероксидазы корней растений картофеля сорта Скарб и его трансгенных линий в полиакриламидном геле, Rf

Relative mobility of root peroxidase isoforms of potato plants of the Skarb variety and its transgenic lines in polyacrylamide gel, Rf

Скарб	Линия Pb 14.10	Линия L 17.2	Линия M 7.3	Скарб	Линия Pb 14.10	Линия L 17.2	Линия M 7.3	Скарб	Линия Pb 14.10	Линия L 17.2	Линия M 7.3
Исходные				24 ч заражения				10 сут. заражения			
–	–	–	–	0,28**	0,28**	0,28**	0,28**	0,28***	0,28**	0,28**	0,28**
–	–	–	–	0,33***	0,33***	0,33***	0,33***	0,33***	0,33***	0,33***	0,33***
–	–	–	–	0,36**	0,36**	0,36***	0,36**	0,36***	0,36**	0,36**	0,36**
–	0,40**	0,40**	0,40**	0,40**	0,40***	0,40***	0,40***	0,40***	0,40***	0,40**	0,40***
–	–	–	–	0,44*	0,44*	0,44***	–	0,44***	0,44*	0,44*	0,44**
0,46**	0,46***	0,46***	0,46***	–	0,46*	0,46**	–	0,46**	0,46*	0,46*	0,46*
0,53**	0,52**	0,52**	0,52	–	–	0,50*	–	0,50*	–	–	0,50*
0,57***	0,57***	0,57*	0,57***	–	–	–	–	0,52*	–	–	–
–	–	–	0,68*	–	–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	0,72*	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание. Звездочками отмечена интенсивность окрашивания полос красителем: * – низкая, ** – средняя, *** – высокая.

изоформ пероксидазы у линии M 7.3 после 10 сут. воздействия фитопатогена, которое мы наблюдали в исходном варианте, и приводило к снижению активности.

Среди исследуемых линий нетипичным характером реакции обладала линия Pb 14.10, трансформированная холостым агробактериальным вектором. В корнях ее растений при общем низком уровне H_2O_2, прослеживаемом на протяжении всех периодов наблюдений, до и через 10 сут. после инфицирования бактериями *Cms* отмечалась более высокая активность пероксидазы, чем у линий M 7.3 и L 17.2. При этом в указанные периоды у линии Pb 14.10 уровень пероксидазной активности был одинаков (см. рис. 2) при существенном различии в составе их изоформ пероксидазы (см. таблицу). В то же время при одинаковом изоферментном спектре пероксидазы у этой линии фиксировалось снижение активности данного фермента и незначительное повышение уровня H_2O_2 в начале контакта с указанными бактериями. С чем это связано, еще предстоит выяснить, но ранее мы наблюдали такую реакции растений табака на трансформацию холостым агробактериальным вектором [14].

Выявленная разная интенсивность полос на электрофореграмме (см. таблицу) свидетельствует о количественной вариабельности данных изоферментов у исследуемых линий. Возможно, отмеченная вариабельность имела отображение на наблюдаемых у этих растений изменениях уровня активности пероксидазы.

Для генетически неоднородных линий описанная картина является характерной. Подтверждением этому служат данные, полученные на нетрансгенных отечественных сортах картофеля *in vitro*, на которых изучали влияние заражения *Cms* на изоферментный состав слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы. Было установлено, что инфицирование растений патогенами приводит к быстрой активации пероксидазы, часто сопровождаемой появлением новых форм и исчезновением некоторых других изоформ фермента [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя вышеизложенное, можно сделать вывод о том, что исследуемые трансгенные линии картофеля, несущие гены *gox* и *gox-mod*, действительно обладают высоким уровнем H_2O_2, что обеспечивает устойчивость корней (клубней) к различным видам бактериальной и грибковой инфекции.

Влияние фитопатогена *Cms* на уровень H_2O_2 в картофеле исходного сорта Скарб и линии Pb 14.10 проявлялось лишь в незначительном его увеличении, а в трансгенных линиях L 17.2 и M 7.3 – в существенном увеличении, несмотря на то, что эти линии исходно обладали высоким уровнем H_2O_2. Через 10 сут. после заражения произошло понижение уровней H_2O_2 у всех исследуемых форм растений, возможно, обусловленное активизацией в этот период каталазы.

Мониторинг активности пероксидазы показал, что через 24 ч и через 10 сут. после заражения фитопатогеном тенденции изменений активности фермента у сорта Скарб и его линий существенно отличались. У линии M 7.3 самый высокий из исследуемых форм растений уровень H_2O_2, возникающий в результате экспрессии целевого гена *gox*, не способствует увеличению активности пероксидазы. Очевидно, это происходит как в отсутствии, так и в присутствии инфекционной нагрузки. Заметно увеличивалась активность пероксидазы после контакта с фитопатогеном у линии L 17.2, уровень H_2O_2 у которой ниже, чем у линии M 7.3, но выше, чем у сорта Скарб и линии Pb 14.10. У линии Pb 14.10, трансформированной холостым агробактериальным вектором, низкий уровень H_2O_2 аналогичен уровню сорта Скарб, но при этом у обсуждаемой линии прослеживается высокая отрицательная зависимость (коэффициент корреляции R = -0,99) между изменяющимися показателями для уровней H_2O_2 и активности пероксидазы в разные периоды наблюдений, включая взаимодействия с *Cms*. Данный факт свидетельствует о хорошо выраженной роли пероксидазы у линии Pb 14.10 в регуляции уровня H_2O_2 в корнях.

При взаимодействии с фитопатогеном происходит кардинальное изменение изоферментного состава пероксидазы и количественной вариабельности этих изоферментов в корнях как исходного сорта Скарб, так и его трансгенных линий. Полагаем, что отмеченная вариабельность имела отображение на наблюдаемых у этих растений изменениях уровня активности пероксидазы.

Хотя высокий уровень H_2O_2 обеспечивает защиту растений от инфекции различными микробными агентами, на фоне инактивации пероксидазы он может приводить к окислительному стрессу и деградации многих клеточных структур и белковых молекул, а также снижению ростовых параметров. Благодаря многоуровневой системе защиты растений от окислительного стресса может происходить активация других ферментов антиоксидантной защиты, например каталазы, полифенолоксидазы и пр., активность которых, возможно, станет предметом дальнейших исследований.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Савчин Д.В., Панюш А.С., Картель Н.А., Генетическая трансформация растений векторными конструкциями с геном *GOX Penicillium funiculosum* // Молекулярная и прикладная генетика. 2011. Т. 12. С. 49–55. EDN: ZYHRUD.

2. Савчин Д.В., Вересова Т.Н., Межнина О.А., Панюш А.С., Вячеслвова А.О., Голденкова-Павлова И.В. Оптимизация кодонового состава грибного гена *gox Penicillium funiculosum* для эффективной экспрессии в растениях *Solanum tuberosum* // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. 2015. N 1. С. 50–55. EDN: TKSWKP.

3. Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Levine E.B., Fitzsimmons K.C., Shah D.M. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H_2O_2-generating glucose oxidase in transgenic potato plants // The Plant Cell. 1995. Vol. 7, no. 9. P. 1357–1368. DOI: 10.1105/tpc.7.9.1357.

4. Jaspers P., Kangasjarvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling // Physiologia Plantarum. 2010. Vol. 138, no. 4. P. 405–413. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01321.x.

5. Киргизова И.В., Гаджимурадов А.М., Омаров Р.Т. Особенности накопления антиоксидантных ферментов у картофеля в условиях биотического и абиотического стресса // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2018. Т. 8. N 4. С. 42–54. DOI: 10.21285/2227-2925-2018-8-4-42-54. EDN: YTDWDJ.

6. Граскова И.А., Боровский Г.Б., Владимирова С.В., Романенко А.С., Войников В.К. Изоферментные спектры пероксидаз картофеля при патогенезе кольцевой гнили // Доклады Академии наук. 2002. Т. 384. N 6. С. 844–847. EDN: LCYKXD.

7. Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Стационарная кинетика совместного окисления гидрохинонов и *о*-дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы хрена // Биохимия. 1999. Т. 64. N 2. С. 219–224.

8. Акимова Г.П., Верхотуров В.В, Соколова М.Г. Влияние *Azotobacter* на активность пероксидазы и содержание перекиси водорода в корнях проростков гороха, инокулированных *Rhizobium* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7. N 4. С. 126–131. DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-4-126-131. EDN: YMQFSN.

9. Акимова Г.П., Соколова М.Г., Нечаева Л.В., Лузова Г.Б., Сидорова К.К. Роль пероксидазы во взаимодействиях растений гороха с *Rhizobium* // Агрохимия. 2002. N 12. С. 37–41.

10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 72. P. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

11. Попов В.Н., Антипина А.В., Астахова Н.В. Изменения ультраструктуры хлоропластов растений табака в процессе защиты от окислительного стресса при гипотермии // Физиология растений. 2016. Т. 63. N 3. С. 319–326. DOI: 10.7868/S0015330316030118. EDN: VTQCER.

12. Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И. Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез / отв. ред. Р.К. Саляев. М.: Изд-во ООО «НПК «ПРОМЭКОБЕЗОПАСНОСТЬ»», 2004. 98 с.

13. Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов: лабораторные методы / пер. с англ.; под ред. Н.Т. Райхлина. М.: Мир, 1982. 272 с.

14. Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Семенова Л.А., Натяганова А.В., Гаманец Л.В., Волкова О.Д. Агробактериальная трансформация как комплексный биотический стрессирующий фактор // Журнал стресс-физиологии и биохимии. 2008. Т. 4. N 1. С. 11–19. EDN: IUINPP.

15. Креславский В.Д., Лось Д.А., Аллахвердиев С.И., Кузнецов В.В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // Физиология растений. 2012. Т. 59. N 2. С. 163–178. EDN: OWEOSH.

16. Chen Z., Silva H., Klessig D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid // Science. 1993. Vol. 262, no. 5141. P. 1883–1886. DOI: 10.1126/science.8266079.

17. Pei Z.-M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells // Nature. 2000. Vol. 406, no. 6797. P. 731–734. DOI: 10.1038/35021067.

18. Galvez-Valdivieso G., Mullineaux P.M. The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus // Physiologia Plantarum. 2010. Vol. 138, no. 4. P. 430–439. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01331.x.

19. Pandey S., Fartyal D., Agarwal A., Shukla T., James D., Kaul T., et al. Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase // Frontiers in Plant Science. 2017. Vol. 8. P. 581. DOI: 10.3389/fpls.2017.00581.

20. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений / отв. ред. Ю.Н. Журавлев. М.: Наука, 1988. 128 с.

21. Campo S., Manrique S., García-Martínez J., San Segundo B. Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression // Plant Biotechnology Journal. 2008. Vol. 6, no. 6. P. 585–608. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2008.00339.x.

22. Arnao M.B., Acosta M., del Rio J.A., García-Cánovas F. Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent // Biochimica et Biophysica Acta. 1990. Vol. 1038, no. 1. P. 85–89. DOI: 10.1016/0167-4838(90)90014-7.

23. Valderrama B., Ayala M., Vazquez-Duhalt R. Suicide inactivation of peroxidases review and the challenge of engineering more robust enzymes // Chemistry & Biology. 2002. Vol. 9, no. 5. P. 555–565. DOI: 10.1016/s1074-5521(02)00149-7.

REFERENCES

1. Sauchyn D.V., Panyush A.S., Kartel N.A. Plant genetic transformation using vectors with *Penicillium funiculosum gox* gene. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika*. 2011;12:49-55. (In Russian). EDN: ZYHRUD.

2. Sauchyn D.V., Veresova T.N., Mezhnina O.A., Panush A.S., Vyacheslavova A.O., Goldenkova-Pavlova I.V. Codon optimization of the fungal *Penicillium funiculosum gox* gene for high-level expression in solanum tuberosum plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2015;1:50-55. (In Russian). EDN: TKSWKP.

3. Wu G., Shortt B.J., Lawrence E.B., Levine E.B., Fitzsimmons K.C., Shah D.M. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H_2O_2-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *The Plant Cell*. 1995;7(9):1357-1368. DOI: 10.1105/tpc.7.9.1357.

4. Jaspers P., Kangasjarvi J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum*. 2010;138(4):405-413. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01321.x.

5. Kirgizova I.V., Gajimuradova A.M., Omarov R.T. Accumulation of antioxidant enzymes in potato plants under the conditions of biotic and abiotic stress. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2018;8(4):42-54. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2018-8-4-42-54. EDN: YTDWDJ.

6. Graskova I.A., Borovskii G.B., Vladimirova S.V., Romanenko A.S., Voinikov V.K. Isozyme spectra of potato peroxidases in ring rod pathogenesis. *Doklady Akademii nauk*. 2002;384(6):844-847. (In Russian). EDN: LCYKXD.

7. Rogozhin V.V., Verkhoturov V.V. Steady-state kinetics of combined oxidation of hydroquinone and *o*-dianisidine by hydrogen peroxide in the presence of horse radish peroxidase. *Biokhimiya*. 1999;64(2):219-224.

8. Akimova G.P., Verkhoturov V.V., Sokolova M.G. The effect of *Azotobacter* on the activity of peroxidase and hydrogen peroxide content in the roots of pea seedlings inoculated with *Rhizobium. Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2017;7(4):126-131.

(In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2017-7-4-126-131. EDN: YMQFSN.

9. Akimova G.P., Sokolova M.G., Nechaeva L.V., Luzova G.B., Sidorova K.K. *Role of peroxidase in pea plant interactions with Rhizobium. Agrokhimiya*. 2002;12:37-41. (In Russian).

10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

11. Popov V.N., Antipina O.V., Astakhova N.V. Changes in chloroplast ultrastructure of tobacco plants in the course of protection from oxidative stress under hypothermia. *Fiziologiya rastenii*. 2016;63(3):319-326. (In Russian). DOI: 10.7868/S0015330316030118. EDN: VTQCER.

12. Pobezhimova T.P., Kolesnichenko A.V., Grabel'nykh O.I. *Methods of studying plant mitochondria. Polarography and electrophoresis*. Moscow: OOO "NPK 'PROMEKOBEZOPASNOST'"; 2004, 98 p. (In Russian).

13. Lojda Z., Gossrau R., Schiebler T.H. Enzyme histochemistry: a laboratory manual; 1979, 339 p. (Russ. ed.: *Gistokhimiya fermentov: laboratornye metody*. Moscow: Mir; 1982, 272 p.).

14. Enikeev A.G., Kopytina T.V., Semenova L.A., Natyaganova A.V., Gamanetz L.V., Volkova O.D. Agrobacterial transformation as complex biotical stressing factor. *Journal of stress physiology & Biochemistry*. 2008;4(1):11-19. (In Russian). EDN: IUINPP.

15. Kreslavski V.D., Allakhverdiev S.I., Los D.A., Kuznetsov V.V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Fiziologiya rastenii*. 2012;59(2):163-178. (In Russian). EDN: OWEOSH.

16. Chen Z., Silva H., Klessig D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*. 1993;262(5141):1883-1886. DOI: 10.1126/science.8266079.

17. Pei Z.-M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*. 2000;406(6797):731-734. DOI: 10.1038/35021067.

18. Galvez-Valdivieso G., Mullineaux P.M. The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus. *Physiologia Plantarum*. 2010;138(4):430-439. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01331.x.

19. Pandey S., Fartyal D., Agarwal A., Shukla T., James D., Kaul T., et al. Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:581. DOI: 10.3389/fpls.2017.00581.

20. Andreeva V.A. *Peroxidase: participation in the defense mechanism of plants*. Moscow: Nauka; 1988, 128 p. (In Russian).

21. Campo S., Manrique S., García-Martínez J., San Segundo B. Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression. *Plant Biotechnology Journal*. 2008;6(6):585-608. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2008.00339.x.

22. Arnao M.B., Acosta M., del Rio J.A., García-Cánovas F. Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1990;1038(1):85-89. DOI: 10.1016/0167-4838(90)90014-7.

23. Valderrama B., Ayala M., Vazquez-Duhalt R. Suicide inactivation of peroxidases review and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry & Biology*. 2002;9(5):555-565. DOI: 10.1016/s1074-5521(02)00149-7.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Филинова Надежда Владимировна,
к.б.н., научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки 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

Ищенко Алексей Александрович,
к.б.н., младший научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
aspt25@yandex.ru
https://orcid.org/0009-0003-4963-3917

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nadezhda V. Filinova,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
filinova_nv@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-0328-6716

Aleksei A. Ishchenko,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
aspt25@yandex.ru
https://orcid.org/0009-0003-4963-3917

Копытина Татьяна Васильевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ kopytina@sifibr.irk.ru
https://orcid.org/0000-0002-3788-0895

Макарова Людмила Евгеньевна,
д.б.н., главный научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
makarova@sifibr.irk.ru
https://orcid.org/0000-0002-4582-8245

Tatyana V. Kopytina,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ kopytina@sifibr.irk.ru
https://orcid.org/0000-0002-3788-0895

Liudmila E. Makarova,
Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
makarova@sifibr.irk.ru
https://orcid.org/0000-0002-4582-8245

Вклад авторов

Н.В. Филинова – проведение исследования, визуализация, валидация результатов, написание черновика рукописи.
А.А. Ищенко – проведение исследования, визуализация.
Т.В. Копытина – разработка концепции, разработка методологии, валидация результатов, написание черновика рукописи.
Л.Е. Макарова – административное руководство исследовательским проектом, научное руководство, редактирование рукописи.

Contribution of the authors

Nadezhda V. Filinova – investigation, visualization, validation, writing – original draft.
Aleksei A. Ischenko – investigation, visualization.
Tatyana V. Kopytina – conceptualization, methodology, validation, writing – original draft.
Liudmila E. Makarova – project administration, supervision, editing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

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 19.08.2024.
Одобрена после рецензирования 13.09.2024.
Принята к публикации 31.05.2025.

Information about the article

The article was submitted 19.08.2024.
Approved after reviewing 13.09.2024.
Accepted for publication 31.05.2025.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 606:57.083.13
EDN: UENDIX
DOI: 10.21285/achb.981

Оптимизация питательной среды для глубинного культивирования штамма *Mycolicibacterium neoaurum* AC-3067D – продуцента *β*-каротина

В.В. Ядерец✉, Н.В. Карпова, Е.В. Глаголева, В.А. Цыганов, А.С. Шибаева, В.В. Джавахия

Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Москва, Российская Федерация.

Аннотация. *Известно, что наибольшее влияние на биосинтез β-каротина Mycolicibacterium neoaurum AC-3067D оказывает замена глюкозы на глицерин. В то же время с технологической точки зрения наличие остаточного глицерина затрудняет процесс сушки биомассы, на основе которой может быть разработана кормовая добавка для сельскохозяйственных птиц и животных. Цель работы заключалась в определении количества глицерина, глюкозы и Твин-80 методом математического планирования (полный факторный эксперимент типа 2^3) и апробации подобранной питательной среды при глубинном культивировании Mycolicibacterium neoaurum в ферментационной установке объемом 3 л. В ходе проведенного исследования осуществлена оценка накопления биомассы Mycolicibacterium neoaurum и содержания в ней β-каротина при замене глицерина (20 г/л) на комбинацию глицерина (10 г/л) и глюкозы (10 г/л). Установлено, что при культивировании Mycolicibacterium neoaurum в среде, содержащей комбинацию глицерина и глюкозы, продуктивность штамма по биомассе и β-каротину сопоставима с контрольными условиями и составляет 17,8 г/л и 182,5 мг/кг соответственно. Исследование также показало, что внесение Твин-80 (1 г/л) в питательную среду увеличило выход биомассы и β-каротина на 14,0 и 32,2% соответственно по сравнению с контролем. Установлено, что при выращивании Mycolicibacterium neoaurum в биореакторе с использованием ростовой среды, состав которой рассчитан с использованием полного факторного эксперимента типа 2^3, содержащей глицерин (15,0 г/л), глюкозу (5,0 г/л) и Твин-80 (1,5 г/л), продуктивность штамма по β-каротину составила 376,5 мг/кг, по биомассе – 25,2 г/л.*

Ключевые слова: *каротиноиды, Mycolicibacterium neoaurum, биосинтез, культивирование, биореактор*

Финансирование. *Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 123012000071-1).*

Для цитирования: Ядерец В.В., Карпова Н.В., Глаголева Е.В., Цыганов В.А., Шибаева А.С., Джавахия В.В. Оптимизация питательной среды для глубинного культивирования штамма *Mycolicibacterium neoaurum* AC-3067D – продуцента *β*-каротина // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 252–261. DOI: 10.21285/achb.981. EDN: UENDIX.

© Ядерец В.В., Карпова Н.В., Глаголева Е.В., Цыганов В.А., Шибаева А.С., Джавахия В.В., 2025

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Optimization of culture medium for submerged cultivation of *Mycolicibacterium neoaurum* AC-3067D – a beta-carotene producing strain

Vera V. Yaderets✉, Natalya V. Karpova, Elena V. Glagoleva, Vladimir A. Tsyganov, Alexandra S. Shibaeva, Vahtang V. Dzhavakhiya

Russian Biotechnological University (BIOTECH University), Moscow, Russian Federation

Abstract. *The replacement of glucose with glycerol has demonstrated the most significant influence on beta-carotene biosynthesis using Mycolicibacterium neoaurum AC-3067D. However, from a technological standpoint, residual glycerol hinders the drying of biomass, which can be used to produce feed additives for poultry and livestock. This study aims to determine the optimal concentrations of glycerol, glucose, and Tween 80 using a 2^3 full factorial experiment, along with testing an optimized medium during the deep cultivation of Mycolicibacterium neoaurum in a 3L bioreactor. We evaluated the accumulation of Mycolicibacterium neoaurum biomass and beta-carotene content in response to the replacement of 20 g/L glycerol with a combination of 10 g/L glycerol and 10 g/L glucose. The results demonstrated comparable productivity of the strain between the modified and control media, yielding 17.8 g/L biomass and 182.5 mg/kg beta-carotene. The study showed that the incorporation of Tween 80 (1 g/L) into the nutrient medium resulted in a 14.0% and 32.2% increase in biomass and beta-carotene yield, respectively, in comparison to the control. The medium, optimized using a 2^3 full factorial experiment, contained glycerol (15.0 g/L), glucose (5.0 g/L), and Tween 80 (1.5 g/L). The cultivation of Mycolicibacterium neoaurum in a bioreactor using this growth medium resulted in a maximum productivity of 376.5 mg/kg of beta-carotene and 25.2 g/L of biomass.*

Keywords: *carotenoids, Mycolicibacterium neoaurum, biosynthesis, cultivation, bioreactor*

Fundings. *The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (theme no. 123012000071-1).*

For citation: Yaderets V.V., Karpova N.V., Glagoleva E.V., Tsyganov V.A., Shibaeva A.S., Dzhavakhiya V.V. Optimization of culture medium for submerged cultivation of *Mycolicibacterium neoaurum* AC-3067D – a beta-carotene producing strain. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2):252-261. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.981. EDN: UENDIX.

ВВЕДЕНИЕ

Каротиноиды (от лат. carota – морковь и греч. eidos – вид) – многочисленная группа органических пигментов, синтезируемых высшими растениями, водорослями, фототрофными бактериями, мицелиальными грибами и дрожжами [1–3]. К настоящему времени известна структура 1158 каротиноидов, синтезируемых более чем 691 видом организмов [4]. Высокая биологическая активность каротиноидов и широкий спектр применения данной группы соединений [1–6] обуславливают постоянный интерес исследователей к поиску эффективных способов их получения.

В настоящее время каротиноиды, как правило, получают или путем экстракции из растительного сырья или методами химического синтеза [6, 7], однако на сегодняшний день можно отметить небезосновательную тенденцию к экологизации производства и замене химических методов на более безопасные. Известно, что альтернативой химическим способам получения являются процессы с использованием микробного синтеза. С этой точки зрения актуальным становится поиск эффективных путей производства каротиноидов с использованием микроорганизмов [8].

Согласно литературным данным, основные исследования сосредоточены на оптимизации условий культивирования гетероталлических штаммов грибов *Blakeslea trispora* [9–11] или дрожжей рода *Rhodotorula* [12, 13]. Перспективными продуцентами каротиноидов могут также являться быстрорастущие непатогенные бактерии рода *Mycolicibacterium* [14]. Ценным преимуществом использования бактерий в качестве продуцентов каротиноидов является отсутствие зависимости биосинтеза от полового цикла микроорганизма, как в случае *B. trispora* [9–11], что способно значительно упростить технологическую схему получения биологически активных соединений и сократить время биосинтеза. В связи с этим получение новых высокоэффективных продуцентов каротиноидов и разработка технологии их получения является актуальным направлением научных исследований настоящего времени.

Учитывая вышесказанное, цель представленного исследования заключалась в оптимизации источника углерода и Твин-80 в ферментационной среде для глубинного культивирования штамма *Mycolicibacterium neoaurum* AC-3067D в биореакторе объемом 3 л.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Используемый в работе штамм получен путем химического мутагенеза с применением N-нитрозо-N-метилмочевины и направленной селекции из штамма *M. neoaurum* Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов Ас-1634 [15]. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Скрябина РАН под номером VKM Ac-3067D.

Для поддержания штамма *M. neoaurum* VKM Ac-3067D использовали агаризованную среду следующего состава, г/л: агар-агар – 17,0, глюкоза – 10,0, соевая мука – 10,0, лимонная кислота – 2,2, мочевина – 0,5, NH_4Cl – 1,0, KH_2PO_4 – 0,5, $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ – 0,5, $FeSO_4 \bullet 7H_2O$ – 0,05, $CaCO_3$ – 1,5 (pH среды 6,8–7,2). Штамм поддерживали в течение 1 месяца при температуре 4 °C, затем пересевали на свежие среды. Хранили *M. neoaurum* при 4 °C в лиофилизированном состоянии, защитной средой служило сухое молоко.

Контрольная жидкая среда (среда АМ), использованная для последующей модификации, имела следующий состав, г/л: глицерин – 20,0, сухое обезжиренное молоко – 10,0, лимонная кислота – 2,2, мочевина – 1,0, NH_4Cl – 1,0, KH_2PO4 – 0,5, $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ – 0,5, $FeSO_4 \bullet 7H_2O$ – 0,05, $CaCO_3$ – 1,5 (pH среды 6,8–7,2). Процесс оптимизации состава питательной среды вели в качалочных колбах объемом 750 мл.

Для получения инокулята в пробирку с культурой приливали 10 мл стерильного физиологического раствора и микробиологической петлей аккуратно снимали слой клеток, который затем переносили в качалочные колбы, содержащие 100 мл среды. Колбы с культурой помещали на 48 ч в шейкер-инкубатор Innova 44R (Eppendorf SE, Германия) с орбитой движения платформы 5,1 см при 220 об/мин и 35 °C. Затем полученный инокулят в количестве 10% об. переносили в колбы с соответствующей питательно средой и выращивали в тех же условиях в течение 48–72 ч. Полученную культуральную жидкость либо использовали для засева ферментационной установки, либо же сушили для определения содержания каротиноидов.

Содержание каротиноидов в биомассе *M. neoaurum* определяли спектрофотометрически [15]. Для этого 30 мл культуральной жидкости центрифугировали при 7500 об/мин в течение 5 мин. Полученный супернатант декантировали, а полученную биомассу экстрагировали 10 мл ацетона 3 раза. Ацетоновые экстракты объединяли, переносили в делительную воронку, добавляли 10 мл петролейного эфира, тщательно встряхивали и вносили 3–5 капель насыщенного раствора NaCl до разрушения эмульсии. Затем отделяли ацетоновый слой и вновь экстрагировали петролейным эфиром. Полученные петролейные экстракты объединяли и фильтровали через стеклянный фильтр. Спектр поглощения экстракта каротиноидов определяли на спектрофотометре Thermo Spectronic (Thermo FS, США) при длине волны 450 нм против растворителя (петролейного эфира). Суммарное содержание каротиноидов, мкг/г, определяли по следующей формуле:

$$\text{Каротиноиды} = \frac{V \times \text{A}450 \times D}{E \times W},$$

где V – объем пробы, мл; A450 – степень поглощения раствора, полученная экспериментально; D – коэффициент разбавления образца; E = 2592 – значение 1% экстинции; W – биомасса сухих клеток, г.

Для глубинного культивирования штамма использовали ферментационную установку общим объемом 3 л (ООО «Проинтех», Россия). Данный биореактор имеет встроенное компьютерное управление, позволяющее регулировать основные ферментационные параметры – pH, скорость перемешивания, температуру и pO_2. В устройства измерения параметров культуральной жидкости в процессе ферментации входят: термодатчик для измерения температуры, связанный с контроллером управления («Бук-3», Россия); датчик для измерения показателя pH (InPro3300/225/PT1000, Mettler Toledo, Швейцария), связанный через управляющий контроллер с перистальтическим насосом, подающим титрующий раствор; датчик измерения растворенного кислорода (InPro 6800/12/220, Mettler Toledo, Швейцария), связанный через управляющий контроллер с механическим перемешивающим устройством.

Питательную среду объемом 1,5 л (pH среды до стерилизации – 6,8–7,2), загружали в биореактор и вместе со средой помещали в автоклав для стерилизации (60–90 мин при 121 °C). Дополнительные жидкие компоненты (растворы глюкозы 2,5 г/л, кислот, щелочей, дистиллированной воды) стерилизовали отдельно в колбах с нижним тубусом, оснащенных соединительными шлангами и иглами. После стерилизации биореактор помещали на ферментационную установку, подключали датчики, потоки воздуха и охлаждающей воды, электродвигатель. Начальное значение содержания pO_2 в среде устанавливали на отметке 100%.

Основные параметры культивирования представлены в табл. 1.

Таблица 1. Режим в ферментере перед посевом

Table 1. Parameters in bioreactor before cultivation

Наименование параметра	Значение показателя
Объем среды	1,5 л
Температура	35±1 °C
Аэрация	0,1 л/мин
Скорость перемешивания среды	250 об/мин
Значение pO_2	100% от насыщения
pH среды	6,8–7,2

Регулировку уровня pO_2 осуществляли путем изменения объема подачи воздуха на объем культуральной жидкости в ручном режиме с изменением количества оборотов перемешивающего устройства в автоматическом режиме. Основные параметры культивирования штамма в 3-литровом ферментере представлены в табл. 2.

Значение pH на уровне 7,0–7,2 поддерживали путем подачи 5%-го раствора HCl при помощи перистальтического насоса в автоматическом режиме. В процессе ферментации каждые 18–22 ч отбирали аликвоту культуральной жидкости для микробиологического контроля чистоты культуры и определения количества биомассы. Продолжительность процесса составляла 72–76 ч. В случае нежелательного пенообразования уменьшали скорость перемешивания среды и вносили пеногаситель (Софэксил-1520А, стерильный 50%-й раствор).

Таблица 2. Режим в ферментере в процессе культивирования

Table 2. Parameters in bioreactor during cultivation

Параметр	Величина показателя
Температура	35±1 °C
Аэрация	0,1 л/мин
pH	7,0–7,2
Перемешивание	Для поддержания необходимого уровня растворенного кислорода (pO_2 не ниже 50%) скорость перемешивания составляет 300–400 об/мин

После окончания ферментации биомассу микалицебактерий инактивировали при температуре 80–85 °C и перемешивании в течение 30 мин. Далее биомассу сливали в приемник, центрифугировали и сушили на лиофильной сушилке (Martin Christ ALPHA 2-4LD plus, Германия).

Эксперименты проводили в 3 повторностях. Полученные результаты статистически обрабатывали с использованием стандартного пакета программы MS Excel 2010.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В биотехнологических процессах, основанных на использовании высокопродуктивных штаммов, основное внимание, помимо создания самого штамма, должно уделяться определению оптимальных условий культивирования [11, 16]. Оптимизация условий культивирования может осуществляться на основе сочетания экспериментального и математического моделирования.

Ранее авторами была проведена серия экспериментов по изучению влияния на накопление биомассы *M. neoaurum* и *β*-каротина таких источников углерода, как глюкоза, фруктоза, сахароза, лактоза, арабиноза, глицерин, маннит и сорбит, количество которых во всех вариантах составляло 20,0 г/л. Контролем служила питательная среда с глюкозой. Установлено, что наибольшее влияние на биосинтез каротиноидов клетками *M. neoaurum* оказывает глицерин. Отмечено увеличение выхода биомассы на 15,1% и содержания *β*-каротина на 14,7% по сравнению с контрольными условиями [15]. Факт стимуляции биосинтеза каротиноидов может быть объяснен тем, что, согласно данным литературы, глицерин участвует в биосинтезе изопреноидов – предшественников каротиноидов. Однако с технологической точки зрения наличие остаточного глицерина в биомассе *M. neoaurum* может сильно затруднять процесс ее сушки. В связи с этим было предложено изучить влияние на накопление биомассы и содержание в ней *β*-каротина, комбинации глицерина и глюкозы в количестве 10,0 г/л каждого компонента. В качестве контроля использовались среды с содержанием глицерина и глюкозы по 20,0 г/л. Результаты представлены на рис. 1.

Как следует из полученных данных, комбинация глицерина и глюкозы позволяет получить аналогичные результаты по выходу биомассы и содержания в ней *β*-каротина.

Согласно данным литературы, внесение в ростовую среду разнообразных по своей природе экзогенных факторов может привести к изменению метаболической

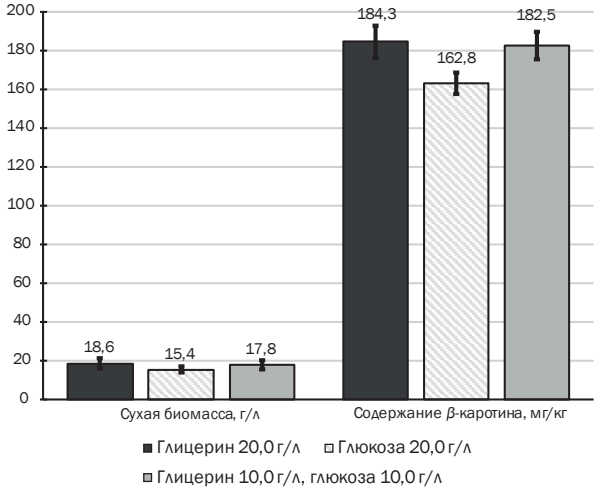


Рис. 1. Накопление биомассы *Mycolicibacterium neoaurum* и *β*-каротина в зависимости от источника углерода в ростовой среде

Fig. 1. Effect of a carbon source on the *Mycolicibacterium neoaurum* biomass accumulation and *β*-carotene production

активности клеток. Так, например, установлено воздействие поверхностно активных веществ на стероидтрансформирующую активность клеток *Mycolicibacterium* [17]. Известна серия экспериментов по увеличению биосинтеза *β*-каротина при культивировании *Phycomyces blakesleeanus* в питательной среде с включением Твин-80 [18]. Данный эффект может быть связан с двумя вещами. С одной стороны, являясь солюбилизатором, Твин-80 способствует более эффективному клеточному массообмену, стимулируя рост микроорганизмов и синтез вторичных метаболитов. С другой стороны, наличие Твин-80 также обеспечивает увеличение растворимости липофильного *β*-каротина и его предшественников, делая их более доступными для ферментных систем, вовлеченных в биосинтез пигментов. В связи с этим было интересным проверить влияние таких солюбилизаторов, как Твин-80, Спан-20 и метил-*β*-циклодекстрин (МЦД) на накопление биомассы *M. neoaurum* и содержание в ней *β*-каротина. Результаты представлены на рис. 2.

Как следует из полученных данных, отображенных на рис. 2, культивирование штамма в ростовой среде, содержащей Твин-80 (1,0 г/л), привело к увеличению выхода биомассы содержащегося в ней *β*-каротина на 14,0 и 32,2% по сравнению с контролем. При внесении в питательную среду Спан-20 (1,0 г/л) и МЦД (2,5 г/л) наблюдалось ингибирование процесса накопления биомассы *M. neoaurum* на 5,6 и 3,4% соответственно. Также отмечено снижение содержания *β*-каротина на 8,5 и 7,0% в средах, содержащих Спан-20 и МЦД по сравнению с контрольными условиями. Ингибирование роста клеток и снижение уровня биосинтеза *β*-каротина в вариантах с МЦД (2,5 г/л) и Спан-20 (1,0 г/л) совпадает с данными литературы [17]. Возможно, лимитирующим фактором являются выбранные концентрации солюбилизаторов, поэтому в будущем следует провести более детальное исследование зависимости между степенью ингибирования роста *M. neoaurum* и концентрациями МЦД и Спан-20.

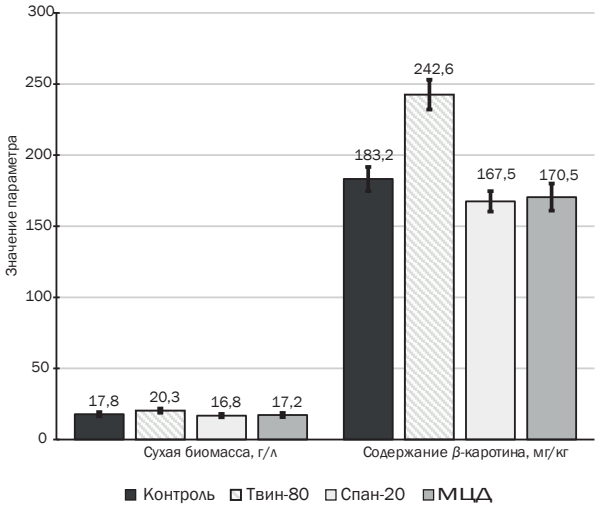


Рис. 2. Накопление биомассы *Mycolicibacterium neoaurum* и *β*-каротина при внесении в ростовую среду Твин-80 (1,0 г/л), Спан-20 (1,0 г/л) и метил-*β*-циклодекстрина (2,5 г/л)

Fig. 2. Effect of Twin-80 (1.0 g/l), Span-20 (1.0 g/l) and methyl-*β*-cyclodextrin (2.5 g/l) on the *Mycolicibacterium neoaurum* biomass accumulation and *β*-carotene production

Клетки миколицибактерий отличаются сложной структурой клеточной стенки, содержащей до 60% липидов, что обуславливает ее высокую гидрофобность и склонность клеток к агрегации в процессе роста в жидкой среде. В то же время при культивировании *M. neoaurum в* присутствии солюбилизаторов культура более однородна, а размер формируемых клеточных скоплений практически в 2–3 раза меньше при сравнении с контрольными условиями.

Оптимизация состава ростовой среды – эффективный метод увеличения биосинтетической активности микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ [19, 20]. Состав среды можно определить двумя способами: эмпирическим подбором или путем использования методов математического планирования эксперимента. Традиционный метод эмпирического подбора широко используется для определения оптимальных условий культивирования микроорганизмов [16]. Тем не менее планирование эксперимента позволяет варьировать одновременно все факторы и получать количественные оценки влияния на выход целевого показателя основных факторов и эффектов взаимодействия между ними с меньшими ошибками, чем традиционные методы однофакторного исследования. Для оценки влияния на биосинтез *β*-каротина клетками *M. neoaurum* глицерина, глюкозы и Твин-80 проведен полный факторный эксперимент. Каждый фактор исследовали на двух уровнях – нижнем (-1) и верхнем (+1) (табл. 3).

Таблица 3. Значения факторов в натуральных переменных, шага варьирования и концентрации основных компонентов ферментационных сред

Table 3. Values of factors in natural variables, units of variation and concentration of the main components of fermentation media

Фактор	x_1	x_2	x_3
Наименование фактора	Концентрация глицерина	Концентрация глюкозы	Концентрация Твин-80
Базовая концентрация параметра, г/л	10,0	10,0	1,0
Шаг варьирования, г/л	5,0	5,0	0,5
–1	5,0	5,0	0,5
+1	15,0	15,0	1,5

Количество опытов определено по формуле

$$N = n^k,$$

где n – количество уровней варьирования, k – количество факторов [16]. В данном исследовании $N = 8$. Исходя из этого построена матрица планирования эксперимента для полного факторного эксперимента типа 2^3. По построенной матрице планирования эксперимента проведена серия экспериментов, каждый опыт выполнен в 3 повторностях. Результаты представлены в табл. 4.

Коэффициенты уравнения регрессии определяли по методу наименьших квадратов[1]. Величина коэффициента

Таблица 4. Матрица планирования для полного факторного эксперимента типа 2^3

Table 4. Experiment planning matrix for 2^3 full factorial experiment

Номер опыта	Факторы в кодированном виде			Факторы в натуральном масштабе, г/л			Выход *β*-каротина, мг/кг
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	
1	-1	-1	-1	5	5	0,5	152,37
2	+1	-1	-1	15	5	0,5	194,17
3	-1	+1	-1	5	15	0,5	162,00
4	+1	+1	-1	15	15	0,5	207,40
5	-1	-1	+1	5	5	1,5	164,03
6	+1	-1	+1	15	5	1,5	258,23
7	-1	+1	+1	5	15	1,5	174,77
8	+1	+1	+1	15	15	1,5	230,07

[1] Рожнов Е.Д. Моделирование биотехнологических процессов: методические рекомендации по выполнению лабораторных работ, проведению практических занятий и организации самостоятельной работы студентов направления подготовки 19.04.01: Биотехнология. Бийск: Изд-во АлтГТУ, 2019. 96 с.

регрессии характеризует вклад каждого фактора (x_i) питательной среды в значение Y (концентрация β-каротина) полученного уравнения регрессии, имеющего вид $Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3$. Проверка значимости коэффициентов регрессии показала, что значимыми коэффициентами являются b_1 и b_3. В связи с этим полином первой степени при проведении планирования полного факторного эксперимента типа 2^3 имел вид $Y = 193{,}0 + 29{,}74x_1 + 14{,}05x_3$. Однородность и воспроизводимость эксперимента оценена по критерию Кохрена (Gp). Для полученных данных $Gp = 0{,}20$, что меньше табличного значения для используемых степеней свободы ($Gp < Gт$, $0{,}20 < 0{,}51$). Исходя из этого, сделан вывод об однородности и воспроизводимости выполненного эксперимента. Проверка адекватности по критерию Фишера[1] полинома первого порядка показала, что $F_P > F_т$ ($10{,}12 > 2{,}85$). Из этого следует, что полученное уравнение неадекватно, то есть данный процесс не может быть описан уравнением линейного приближения. Ко всему прочему, полученные результаты свидетельствует о близости процесса к околооптимальной области, когда усиливается влияние взаимодействия факторов.

В связи с вышесказанным принято решение о построении новой матрицы планирования эксперимента, учитывающей взаимное влияние факторов друг на друга, и рассчитаны коэффициенты взаимодействия (табл. 5).

Полученное уравнение регрессии имело следующий вид:

$$Y = 193{,}03 + 29{,}74x_1 + 14{,}05x_3 - 4{,}57x_1x_2 -$$

$$- 5{,}47x_2x_3 + 7{,}94x_1x_3 - 5{,}47x_1x_2x_3.$$

Рассчитанное значение критерия Фишера $F_p = 2{,}24$. Табличное значение критерия Фишера $F_т$ определяют при $f_{ад} = 1$ и $f = 16$. Поскольку $F_p < F_т$ ($2{,}19 < 4{,}49$), полученное уравнение регрессии адекватно изучаемому процессу. Таким образом, согласно данным, полученным в результате построения математической модели, и выполненным расчетам можно заключить, что на накопление β-каротина клетками *M. neoaurum* в изучаемой области концентраций положительно влияют увеличение количества глицерина и Твин-80. В то же время эффект от данных факторов усиливается от совместного действия факторов x_1, x_2 и x_3 при условии, что факторы находятся на высшем уровне координирования. По итогам эксперимента была предложена ростовая среда, содержащая глицерин (15,0 г/л), глюкозу (5,0 г/л) и Твин-80 (1,5 г/л).

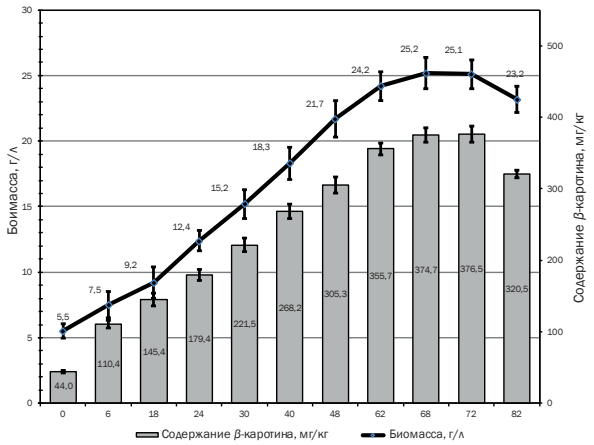


Рис. 3. Накопление биомассы и β-каротина в культуральной жидкости *Mycolicibacterium neoaurum* при культивировании в биореакторе объемом 3 л с внесением подпитки (раствор глюкозы 2,5 г/л) на 30 ч ферментации

Fig. 3. Accumulation of biomass and β-carotene during *Mycolicibacterium neoaurum* cultivation in a 3-L bioreactor with the addition of glucose solution 2.5 g/l for 30 h of fermentation

Далее представлялось интересным провести культивирование штамма в биореакторе объемом 3 л в подобранной питательной среде. Ферментацию *M. neoaurum* вели в условиях поддержания pH среды (7,0–7,2) и концентрации растворенного кислорода (50%). Твин-80 в количестве 1,5 г/л вносили до стерилизации.

Понижение концентрации быстро метаболизирующихся сахаров, включая глюкозу, может привести к нарушению биосинтеза вторичных метаболитов, в том числе β-каротина. В периодических процессах данная проблема может быть решена путем периодической подачи лимитирующего субстрата, что позволяет избежать репрессивного эффекта начальной высокой концентрации субстрата и увеличить выход целевого метаболита. В связи с этим после 30 ч ферментации было обеспечено одноразовое добавление стерильного раствора глюкозы

Таблица 5. План опыта и результаты, полученные при его реализации

Table 5. Experimental design and the results obtained during its implementation

Номер опыта	Факторы в натуральном масштабе, г/л			Факторы в кодированном виде			Вспомогательные графы в матрице полного факторного эксперимента типа 2^3				Выход β-каротина, мг/л
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_2x_3	x_1x_3	$x_1x_2x_3$	$\bar{y}_u$
1	5	5	0,50	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	152,37
2	15	5	0,50	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+	194,17
3	5	15	0,50	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	162,00
4	15	15	0,50	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	207,40
5	5	5	1,50	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+	164,03
6	15	5	1,50	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	258,23
7	5	15	1,50	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	174,77
8	15	15	1,50	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	230,07

(2,5 г/л) в объеме 100 мл при контролируемых оптимальных значениях pH и концентрации pO_2 (7,0–7,2 и 50% соответственно). Добавление глюкозы начиналось в автоматическом режиме, когда значение pH превышало 7,0, а значение растворенного кислорода уменьшалось. Результаты представлены на рис. 3. Продуктивность *M. neoaurum* по *β*-каротину и максимальный прирост биомассы были отмечены на 68–72 ч культивирования и составили 376,5 мг/кг и 25,2 г/л соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с полученными данными могут быть сделаны следующие выводы:

1. Согласно проведенным исследованиям и построенным уравнениям регрессии установлено, что наибольшее влияние на биосинтез *β*-каротина клетками *M. neoaurum* оказывают такие факторы, как концентрация глицерина и Твин-80.

2. С использованием метода математического планирования определены концентрации глицерина, глюкозы и Твин-80, составившие 15,0, 5,0 и 1,5 г/л соответственно. При культивировании *M. neoaurum* в колбах в подобранных условиях продуктивность штамма по *β*-каротину составила 258,23 мг/кг.

3. При культивировании *M. neoaurum* в биореакторе объемом 3 л с использованием питательной среды разработанного состава и внесением на 30 ч культивирования подпитки в виде 100 мл раствора глюкозы (2,5 г/л) выход *β*-каротина составил 376,5 мг/кг, биомассы – 25,2 г/л.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Pagels F., Vasconcelos V., Guedes A.C. Carotenoids from cyanobacteria: biotechnological potential and optimization strategies // Biomolecules. 2021. Vol. 11, no. 5. P. 735. DOI: 10.3390/biom11050735.

2. Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments // Journal of Natural Medicines. 2020. Vol. 74. P. 1–16. DOI: 10.1007/s11418-019-01364-x.

3. Ashokkumar V., Flora G., Sevanan M., Sripriya R., Chen W.H., Park J.-H., et al. Technological advances in the production of carotenoids and their applications – a critical review // Bioresource Technology. 2023. Vol. 367. P. 128215. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.128215.

4. Foong L.C., Loh C.W.L., Ng H.S., Lan J.C.-W. Recent development in the production strategies of microbial carotenoids // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2021. Vol. 37. P. 12. DOI: 10.1007/s11274-020-02967-3.

5. Novoveská L., Ross M.E., Stanley M.S., Pradelles R., Wasiolek V., Sassi J.-F. Microalgal carotenoids: a review of production, current markets, regulations, and future direction // Marine Drugs. 2019. Vol. 17, no. 11. P. 640. DOI: 10.3390/md17110640.

6. Jing Y., Wang Y., Zhou D., Wang J., Li J., Sun J., et al. Advances in the synthesis of three typical tetraterpenoids including *β*-carotene, lycopene and astaxanthin // Biotechnology Advances. 2022. Vol. 61. P. 108033. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.108033.

7. Naz T., Ullah S., Nazir Y., Li S., Iqbal B., Liu Q., et al. Industrially important fungal carotenoids: advancements in biotechnological production and extraction // Journal of Fungi. 2023. Vol. 9, no. 5. P. 578. DOI: 10.3390/jof9050578.

8. Silva Igreja W., de Andrade Maia F., Santos Lopes A., Campos Chisté R. Biotechnological production of carotenoids using low cost-substrates is influenced by cultivation parameters: a review // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22, no. 16. P. 8819. DOI: 10.3390/ijms22168819.

9. Luo W., Gong Z., Li N., Zhao Y., Zhang H., Yang X., et al. A negative regulator of carotenogenesis in *Blakeslea trispora* // Applied and Environmental Microbiology. 2020. Vol. 86, no. 6. P. e02462–e024619. DOI: 10.1128/AEM.02462-19.

10. Roukas T. The role of oxidative stress on carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation // Critical Reviews in Biotechnology. 2016. Vol. 36, no. 3. P. 424–433. DOI: 10.3109/07388551.2014.989424.

11. Shariati S., Zare D., Mirdamadi S. Screening of carbon and nitrogen sources using mixture analysis designs for carotenoid production by *Blakeslea trispora* // Food Science and Biotechnology. 2019. Vol. 28. P. 469–479. DOI: 10.1007/s10068-018-0484-0.

12. Gong G., Liu L., Zhang X., Tan T. Comparative evaluation of different carbon sources supply on simultaneous production of lipid and carotene of *Rhodotorula glutinis* with irradiation and the assessment of key gene transcription // Bioresource Technology. 2019. Vol. 288. P. 121559. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121559.

13. Kot A.M., Błażejak S., Kurcz A., Gientka I., Kieliszek M. *Rhodotorula glutinis* – potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries // Applied Microbiology and Biotechnology. 2016. Vol. 100. P. 6103–6117. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8.

14. Tran T., Dawrs S.N., Norton G.J., Virdi R., Honda J.R. Brought to you courtesy of the red, white, and blue-pigments of nontuberculous mycobacteria // AIMS Microbiology. 2020. Vol. 6, no. 4. P. 434–450. DOI: 10.3934/microbiol.2020026.

15. Yaderets V.V., Karpova N., Glagoleva E.V., Shibaeva A., Dzhavakhiya V. Enhanced *β*-carotene production in *Mycolicibacterium neoaurum* Ac-501/22 by combining mutagenesis, strain selection, and subsequent fermentation optimization // Fermentation. 2023. Vol. 9, no. 12. P. 1007. DOI: 10.3390/fermentation9121007.

16. Попова Е.Д., Глаголев В.И., Савушкин В.А., Овчинников А.И., Савельева В.В., Джавахия В.В. [и др.]. Оптимизация ферментационной среды для культивирования штамма *Amycolatopsis orientalis* VKM Ac-2717D – продуцента антибиотика эремомицина // Международный научно-исследовательский журнал. 2017. N 1-2. С. 16–21. DOI: 10.23670/IRJ.2017.55.008. EDN: XRHEUX.

17. Donova M.V., Nikolayeva V.M., Dovbnya D.V., Gulevskaya S.A., Suzina N.E. Methyl-*β*-cyclodextrin alters growth, activity and cell envelope features of sterol-transforming mycobacteria // Microbiology. 2007. Vol. 153, no. 6. P. 1981–1992. DOI: 10.1099/mic.0.2006/001636-0.

18. Murillo F.J., Torres-Martinez S., Aragon C.M.G., Cerda-Olmedo E. Substrate transfer in carotene biosynthesis in phycomyces // European Journal of Biochemistry. 1981. Vol. 119, no. 3. P. 511–516. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05637.x.

19. Dyaa A., Soliman H., Abdelrazak A., Samra B.N., Khojah E., Ahmed A.F., et al. Optimization of carotenoids production from *Rhodotorula* sp. strain ATL72 for enhancing its biotechnological applications // Journal of Fungi. 2022.

Vol. 8, no 2. P. 160. DOI: 10.3390/jof8020160.

20. Ekpenyong M., Asitok A., Antigha R., Ogarekpe N., Ekong U., Asuquo M., et al. Bioprocess optimization of nutritional parameters for enhanced anti-leukemic l-asparaginase production by *Aspergillus candidus* UCCM 00117: a sequential statistical approach // International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2021. Vol. 27. P. 1501–1527. DOI: 10.1007/s10989-021-10188-x.

REFERENCES

1. Pagels F., Vasconcelos V., Guedes A.C. Carotenoids from cyanobacteria: biotechnological potential and optimization strategies. *Biomolecules*. 2021;11(5):735. DOI: 10.3390/biom11050735.

2. Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*. 2020;74:1-16. DOI: 10.1007/s11418-019-01364-x.

3. Ashokkumar V., Flora G., Sevanan M., Sripriya R., Chen W.H., Park J.-H., et al. Technological advances in the production of carotenoids and their applications – a critical review. *Bioresource Technology*. 2023;367:128215. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.128215.

4. Foong L.C., Loh C.W.L., Ng H.S., Lan J.C.-W. Recent development in the production strategies of microbial carotenoids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2021;37:12. DOI: 10.1007/s11274-020-02967-3.

5. Novoveská L., Ross M.E., Stanley M.S., Pradelles R., Wasiolek V., Sassi J.-F. Microalgal carotenoids: a review of production, current markets, regulations, and future direction. *Marine Drugs*. 2019;17(11):640. DOI: 10.3390/md17110640.

6. Jing Y., Wang Y., Zhou D., Wang J., Li J., Sun J., et al. Advances in the synthesis of three typical tetraterpenoids including *β*-carotene, lycopene and astaxanthin. *Biotechnology Advances*. 2022;61:108033. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.108033.

7. Naz T., Ullah S., Nazir Y., Li S., Iqbal B., Liu Q., et al. Industrially important fungal carotenoids: advancements in biotechnological production and extraction. *Journal of Fungi*. 2023;9(5):578. DOI: 10.3390/jof9050578.

8. Silva Igreja W., de Andrade Maia F., Santos Lopes A., Campos Chisté R. Biotechnological production of carotenoids using low cost-substrates is influenced by cultivation parameters: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(16):8819. DOI: 10.3390/ijms22168819.

9. Luo W., Gong Z., Li N., Zhao Y., Zhang H., Yang X., et al. A negative regulator of carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020;86(6):e02462-e024619. DOI: 10.1128/AEM.02462-19.

10. Roukas T. The role of oxidative stress on carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016;36(3):424-433. DOI: 10.3109/07388551.2014.989424.

11. Shariati S., Zare D., Mirdamadi S. Screening of carbon and nitrogen sources using mixture analysis designs for carotenoid production by *Blakeslea trispora*. *Food Science and Biotechnology*. 2019;28:469-479. DOI: 10.1007/s10068-018-0484-0.

12. Gong G., Liu L., Zhang X., Tan T. Comparative evaluation of different carbon sources supply on simultaneous production of lipid and carotene of *Rhodotorula glutinis* with irradiation and the assessment of key gene transcription. *Bioresource Technology*. 2019;288:121559. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121559.

13. Kot A.M., Błażejak S., Kurcz A., Gientka I., Kieliszek M. *Rhodotorula glutinis* – potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100:6103-6117. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8.

14. Tran T., Dawrs S.N., Norton G.J., Virdi R., Honda J.R. Brought to you courtesy of the red, white, and blue-pigments of nontuberculous mycobacteria. *AIMS Microbiology*. 2020;6(4):434-450. DOI: 10.3934/microbiol.2020026.

15. Yaderets V.V., Karpova N., Glagoleva E.V., Shibaeva A., Dzhavakhiya V. Enhanced *β*-carotene production in *Mycolicibacterium neoaurum* Ac-501/22 by combining mutagenesis, strain selection, and subsequent fermentation optimization. *Fermentation*. 2023;9(12):1007. DOI: 10.3390/fermentation9121007.

16. Popova E.D., Glagolev V.I., Savushkin V.A., Ovchinnikov A.I., Saveleva V.V., Dzhavakhiya V.V., et al. Optimization of fermentation medium for the cultivation of *Amycolatopsis orientalis* VKM Ac-2717D, a producer of the antibiotics eremomycin. *International Research Journal*. 2017;1-2:16-21. (In Russian). DOI: 10.23670/IRJ.2017.55.008. EDN: XRHEUX.

17. Donova M.V., Nikolayeva V.M., Dovbnya D.V., Gulevskaya S.A., Suzina N.E. Methyl-*β*-cyclodextrin alters growth, activity and cell envelope features of sterol-transforming mycobacteria. *Microbiology*. 2007;153(6):1981-1992. DOI: 10.1099/mic.0.2006/001636-0.

18. Murillo F.J., Torres-Martinez S., Aragon C.M.G., Cerda-Olmedo E. Substrate transfer in carotene biosynthesis in phycomyces. *European Journal of Biochemistry*. 1981;119(3):511-516. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05637.x.

19. Dyaa A., Soliman H., Abdelrazak A., Samra B.N., Khojah E., Ahmed A.F., et al. Optimization of carotenoids production from *Rhodotorula* sp. strain ATL72 for enhancing its biotechnological applications. *Journal of Fungi*. 2022;8(2):160. DOI: 10.3390/jof8020160.

20. Ekpenyong M., Asitok A., Antigha R., Ogarekpe N., Ekong U., Asuquo M., et al. Bioprocess optimization of nutritional parameters for enhanced anti-leukemic l-asparaginase production by *Aspergillus candidus* UCCM 00117: a sequential statistical approach. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2021;27:1501-1527. DOI: 10.1007/s10989-021-10188-x.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Ядерец Вера Владимировна,
к.б.н., заведующий лабораторией,
Российский биотехнологический
университет (РОСБИОТЕХ),
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11,
Российская Федерация,
✉ verayaderetz@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-5220-7877

Карпова Наталья Викторовна,
к.б.н., научный сотрудник,
Российский биотехнологический
университет (РОСБИОТЕХ),
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11,
Российская Федерация,
ashatanr@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-6652-4136

Глаголева Елена Викторовна,
научный сотрудник,
Российский биотехнологический
университет (РОСБИОТЕХ),
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11,
Российская Федерация,
glagolevaev@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-3894-0255

Цыганов Владимир Алексеевич,
младший научный сотрудник,
Российский биотехнологический
университет (РОСБИОТЕХ),
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11,
Российская Федерация,
ts_wladimir@inbox.ru
https://orcid.org/0000-0002-3658-519X

Шибаева Александра Сергеевна,
младший научный сотрудник,
Российский биотехнологический
университет (РОСБИОТЕХ),
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11,
Российская Федерация,
aleksandrashibaeva@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-1115-6532

Джавахия Вахтанг Витальевич,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Российский биотехнологический
университет (РОСБИОТЕХ),
125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11,
Российская Федерация,
vahoru@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-5161-5051

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Vera V. Yaderets,
Cand. Sci. (Biology), Head of the Laboratory,
Russian Biotechnological University
(BIOTECH University),
11, Volokolamskoe Sh., Moscow, 125080,
Russian Federation,
✉ verayaderetz@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-5220-7877

Natalya V. Karpova,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Russian Biotechnological University
(BIOTECH University),
11, Volokolamskoe Sh., Moscow, 125080,
Russian Federation,
ashatanr@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-6652-4136

Elena V. Glagoleva,
Researcher,
Russian Biotechnological University
(BIOTECH University),
11, Volokolamskoe Sh., Moscow, 125080,
Russian Federation,
glagolevaev@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-3894-0255

Vladimir A. Tsyganov,
Junior Researcher,
Russian Biotechnological University
(BIOTECH University),
11, Volokolamskoe Sh., Moscow, 125080,
Russian Federation,
ts_wladimir@inbox.ru
https://orcid.org/0000-0002-3658-519X

Alexandra S. Shibaeva,
Junior Researcher,
Russian Biotechnological University
(BIOTECH University),
11, Volokolamskoe Sh., Moscow, 125080,
Russian Federation,
aleksandrashibaeva@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-1115-6532

Vahtang V. Dzhavakhiya,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Russian Biotechnological University
(BIOTECH University),
11, Volokolamskoe Sh., Moscow, 125080,
Russian Federation,
vahoru@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-5161-5051

Вклад авторов

В.В. Ядерец – разработка концепции, разработка методологии, административное руководство исследовательским проектом, редактирование рукописи.
Н.В. Карпова – разработка методологии, проведение исследования, написание черновика рукописи.
Е.В. Глаголева – научное руководство, курирование данных.
В.А. Цыганов – проведение исследования, валидация результатов.
А.С. Шибаева – проведение исследования, визуализация.
В.В. Джавахия – формальны анализ, редактирование рукописи, предоставление ресурсов.

Contribution of the authors

Vera V. Yaderets – conceptualization, methodology, project administration, editing.
Natalya V. Karpova – methodology, investigation, writing – original draft.
Elena V. Glagoleva – supervision, data curation.
Vladimir A. Tsyganov – investigation, validation.
Alexandra S. Shibaeva – investigation, visualization.
Vahtang V. Dzhavakhiya – formal analysis, editing, resources.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

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 18.07.2024.
Одобрена после рецензирования 11.12.2024.
Принята к публикации 31.05.2025.

Information about the article

The article was submitted 18.07.2024.
Approved after reviewing 11.12.2024.
Accepted for publication 31.05.2025.

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 541.64
EDN: QCJMIR
DOI: 10.21285/achb.971

Влияние состава блок-сополимеров на основе стирола и бутадиена на свойства полимерных битумных вяжущих

А.А. Кривошеин✉, Н.С. Шаглаева

Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. *Нефтяные дорожные битумы для строительства автомобильных, мостовых и аэродромных покрытий не удовлетворяют предъявляемым к ним требованиям по трещиностойкости, теплостойкости, эластичности, адгезии к поверхности минеральных материалов. Введение в состав нефтяных дорожных битумов термоэластопластов повышает эксплуатационные свойства покрытия. Данные обстоятельства определяют актуальность исследований в этой области. Данная работа посвящена получению полимер-битумных композиций при добавлении в нефтяной дорожный битум блок-сополимеров на основе стирола и бутадиена, пластификатора, а также изучению некоторых его свойств. В качестве пластификатора было использовано индустриальное масло И-40 производства АО «Ангарская нефтехимическая компания». Для проведения исследований были испытаны нефтяные дорожные битумы БНД 100/130, блок-сополимеры стирола и бутадиена производства России и Китая. В инфракрасном спектре сополимеров наблюдаются полосы поглощения при 3061, 3024, 1640, 1601, 1450, 1493, 756, 730, 659 см$^{-1}$, которые относятся к стирольным звеньям, фрагменты бутадиена регистрируются в области 994, 964 и 911 см$^{-1}$. По данным элементного анализа, содержание бутадиеновых фрагментов в сополимере производства Китая в 3,1 раза больше, чем в сополимере производства России. Установлено, что при увеличении процентного содержания сополимера в нефтяном дорожном битуме динамическая вязкость и значение растяжимости композиции возрастают, а температура его хрупкости понижается. С увеличением содержания бутадиеновых звеньев в сополимере динамическая вязкость, температура размягчения и хрупкости, значения пенетрации и растяжимости возрастают, причем для сополимера производства Китая данные значения выше аналогичных величин, характерных для сополимера производства России.*

Ключевые слова: *полимерно-битумные вяжущие, пластификатор, нефтяной дорожный битум, сополимер стирол–бутадиен–стирол*

Для цитирования: Кривошеин А.А., Шаглаева Н.С. Влияние состава блок-сополимеров на основе стирола и бутадиена на свойства полимерных битумных вяжущих // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 262–268. DOI: 10.21285/achb.971. EDN: QCJMIR.

CHEMICAL SCIENCES

Original article

Effect of styrene/butadiene block copolymer composition on the properties of polymer bitumen binders

Andrey A. Krivoshein✉, Nina S. Shaglaeva

Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. *Paving bitumens intended for use in the construction of road, bridge, and airfield pavements do not meet the requirements for crack resistance, heat resistance, elasticity, and adhesion to the surface of mineral materials. Pavement performance can be improved by the addition of thermoplastic elastomers to paving bitumens. These factors determine the relevance of research in this area. This study focused on obtaining polymer bitumen compositions by the addition*

© Кривошеин А.А., Шаглаева Н.С., 2025

of styrene/butadiene block copolymers and a plasticizer to paving bitumen, as well as studying some of its properties. Industrial oil I-40 produced by Angarsk Petrochemical Company was used as the plasticizer. BND 100/130 bitumen and styrene/butadiene block copolymers produced in Russia and China were tested. The infrared spectrum of the copolymers exhibits styrene-related absorption bands at 3061, 3024, 1640, 1601, 1450, 1493, 756, 730, and 659 cm^{-1}; butadiene segments are recorded around 994, 964, and 911 cm^{-1}. The elemental analysis shows that the content of butadiene segments is 3.1 times higher in the Chinese copolymer than in the copolymer produced in Russia. It was found that with the increasing percentage of copolymer content in the paving bitumens, the dynamic viscosity and extensibility of the composition increase, and its brittleness temperature decreases. With the growing content of butadiene units in the copolymer, dynamic viscosity, softening and brittleness temperatures, penetration, and extensibility increase; for the Chinese copolymer, these parameters are higher than those of the copolymer produced in Russia.

Keywords: *polymer bitumen binders, plasticizer, paving bitumen, styrene–butadiene–styrene copolymer*

For citation: Krivoshein A.A., Shaglaeva N.S. Effect of styrene/butadiene block copolymer composition on the properties of polymer bitumen binders. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2):262-268. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.971. EDN: QCJMIR.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие дорожно-транспортной инфраструктуры в России является важным направлением формирования национальной экономики и промышленности. Высокое качество современных автомобильных дорог способствует экономическому росту страны, а также повышению качества жизни граждан. В связи с этим строительство дорожных и мостовых покрытий, обладающих высокими эксплуатационными характеристиками, является приоритетной задачей дорожно-строительной отрасли России.

Применение нефтяного дорожного битума в качестве асфальтобетонных покрытий не обеспечивает требуемой долговечности дорожного полотна из-за низкой стойкости к динамической нагрузке, теплостойкости, эластичности и адгезии к минеральным материалам кислых пород. Повышение качества и долговечности автомобильных дорог удается достичь при использовании полимерно-битумных вяжущих, которые состоят из нефтяного дорожного битума, (со)полимеров различных классов, пластификатора и поверхностно-активного вещества [1–10].

Поверхностно-активное вещество обеспечивает необходимую адгезию к минеральным материалам кислых и основных пород. Пластифицирующие добавки снижают температуру хрупкости и не влияют на температуру размягчения полимерно-битумных вяжущих [11, 12]. В качестве пластификатора находит применение индустриальное масло, поскольку его температура вспышки превышает 200 °С. Кроме того, при температуре 140–150 °С индустриальное масло образует устойчивую композицию с битумом и сополимерами на основе стирола и бутадиена. Доля вводимого индустриального масла в полимерно-битумных вяжущих составляет от 5 до 20%. Основной целью введения (со)полимеров в битум является расширение температурного интервала эксплуатации дорожного полотна. Полимерная матрица способствует увеличению температуры размягчения и вязкости полимерно-битумных вяжущих и придает ему эластичные свойства.

Введение блок-сополимеров на основе стирола и бутадиена (блок-сополимеров типа стирол–бутадиен–стирол (СБС)) в нефтяной дорожный битум повышает физико-механические свойства полимерно-битумных вяжущих [2, 13–22]. Это означает, что модифицирование нефтяного дорожного битума блок-сополимерами СБС является одним из перспективных способов решения проблемы прочности и долговечности дорожного полотна.

В связи с вышесказанным целью проведенного исследования являлось изучение влияния состава блок-сополимеров СБС на свойства полимерных битумных вяжущих.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для проведения исследований были испытаны нефтяные дорожные битумы БНД 100/130, сополимеры СБС-1 (производство Россия), СБС-2 (производство Китай). В качестве пластификатора использовали индустриальное масло И-40 (производство АО «Ангарская нефтехимическая компания»).

Получение модифицированного полимерно-битумного вяжущего осуществляли двумя способами.

Первый способ заключался в том, что к нефтяному дорожному битуму, предварительно нагретому до температуры 100 °С, добавили при перемешивании рассчитанное количество сополимера СБС (1, 2, 3% от общей массы), масло индустриальное И-40 (соотношение И-40 к сополимеру СБС составляло 8:1) с последующим повышением температуры до 175 °С. Перемешивание осуществляли при температуре 175 °С в течение 6 ч, затем полученную смесь охлаждали до комнатной температуры.

В рамках второго способа вначале к сополимеру СБС (1, 2, 3%) добавили при перемешивании масло индустриальное И-40 (соотношение И-40 к сополимеру СБС составляло 8:1), полученную смесь выдерживали при температуре 100 °С в течение 1 ч. Далее к нефтяному дорожному битуму, предварительно нагретому до температуры 100 °С, добавили заранее подготовленную смесь с последующим повышением температуры до 175 °С. Перемешивание осуществляли при температуре 175 °С в течение 6 ч, затем полученную смесь охлаждали до комнатной температуры.

Элементный анализ продуктов реакции проводили на газоанализаторе Thermo Finnigan (Thermo Finnigan, Италия).

Расчет состава сополимеров осуществляли по методике, приведенной в работе [23]:

$$C = \frac{a_1 X + a_2 \times (100 - X)}{100} = \frac{100 a_2 \times X (a_1 - a_2)}{100},$$
$$C = \frac{a_1 Y + a_2 \times (100 - Y)}{100} = \frac{100 a_2 \times Y (a_1 - a_2)}{100},$$

где C – содержание углерода по данным элементного анализа; X – содержание стирольных звеньев в сопо-

лимере; *У* – содержание бутадиеновых звеньев в сополимере; a_1 – содержание углерода в мономере стирола *X*; a_2 – содержание углерода в мономере бутадиена *У*.

Инфракрасные (ИК) спектры сополимеров были сняты на спектрометре IFS-25 (Bruker, Германия) в виде пленок, полученных из растворов сополимера СБС в толуоле.

Групповой анализ индустриального масла И-40 проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием пластинок Silufol. В качестве элюента использовали: толуол, бензол, октан, гептан, петролейный эфир. Пробы наносили микрошприцем по 1 мкл на пластинку ТСХ. После испарения растворителя пластинку опускали в разделительную камеру с элюентом.

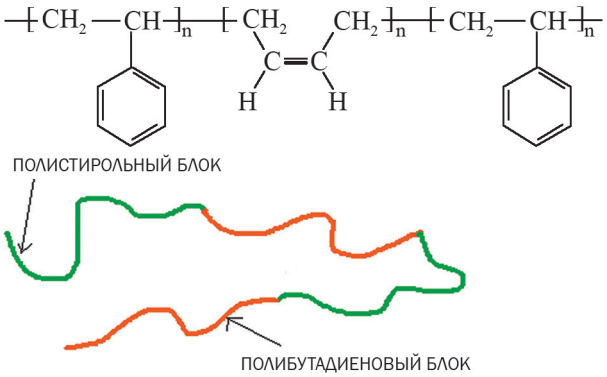
Плотность индустриального масла И-40 определяли с помощью пикнометра и ареометра.

Определение температуры хрупкости и размягчения, значений растяжимости и пенетрации полученных полимерно-битумных вяжущих проводили согласно требованиям ГОСТ Р 52056-2003[1].

Измерение динамической вязкости полимерно-битумных вяжущих проводили на ротационном вискозиметре серии Smart (FungiLab, Испания) (ГОСТ 33137-2014[2]).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Блок-сополимер СБС состоит из блоков стирола, разделенных блоками бутадиена:



Блоки, состоящие из звеньев стирола и бутадиена, цепляясь своими концевыми группами один к другому, образуют структуру, напоминающую сетку, которая обладает разными физическими свойствами [9–12].

Полибутадиен остается эластичным при температуре минус 60 °С, тогда как полистирольные звенья остаются жесткими до температуры стеклования полистирола, достигающей 100 °С. Каждая составляющая сополимера отвечает за эластичность в различных температурных диапазонах, что позволяет сополимеру СБС демонстрировать эластичные свойства в широком температурном спектре. В результате растворения блок-сополимера в битуме образуются структуры, способствующие повышению теплостойкости (полимерно-битумных вяжущих) по сравнению с исходным битумом. Пластифицирующие добавки в полимерно-битумных вяжущих не только содействуют более эффективному растворению полимера в битуме, но и понижают температуру хрупкости композиции [13–18]. Наиболее востребованными и эффективными пластификаторами считаются индустриальные масла марок И-20, И-30, И-40. Изучение группового состава индустриального масла И-40 методом ТСХ (табл. 1) показало высокое содержание ароматических соединений (64%), а также смол (20%), парафинов и нафтенов (16%). В связи с этим предполагается, что содержание в составе индустриального масла И-40 ароматических соединений, смол, парафинов и нафтенов будет способствовать растворению сополимера СБС в полимерно-битумных вяжущих с образованием однородной и устойчивой смеси.

Сополимеры СБС-1 и СБС-2 представляют собой порошкообразные вещества кремового цвета и по внешнему виду не различаются. Перед проведением элементного анализа сополимеры перемешивали и измельчали в мелкий порошок, и после такой подготовки образцов проводили их элементный анализ. На основании данных элементного анализа рассчитаны количества стирольных и бутадиеновых звеньев в сополимере СБС (табл. 2). Содержание стирольных звеньев в сополимере СБС-1 в 2,2 раза больше, чем в сополимере СБС-2, а количество бутадиеновых фрагментов в сополимере СБС-2 в 3,1 раза больше, чем в сополимере СБС-1.

ИК-спектры сополимеров СБС-1 и СБС-2 идентичны (рисунок). В ИК-спектре сополимеров наблюдаются полосы поглощения при 3061, 3024, 1640, 1601, 1450, 1493, 756, 730, 659 см$^{-1}$, которые относятся к стирольным звеньям, фрагменты бутадиена регистрируются в области 994, 964 и 911 см$^{-1}$.

Предполагалось, что способ подготовки исходных компонентов для получения полимерно-битумных вяжущих будет влиять на их свойства, поэтому эксперименты проводились двумя методами:

Таблица 1. Групповой анализ экстракта селективной очистки масел

Table 1. Group analysis of the extract of selective oil purification

Исследуемое вещество	Содержание ароматических соединений, %	Содержание парафинов и нафтенов, %	Содержание смол, %	Содержание фракций, не растворимых в петролейном эфире, %	Плотность, г/см^3	Условная вязкость при 100 °С
И-40	64	16	20	0	0,869	10,2

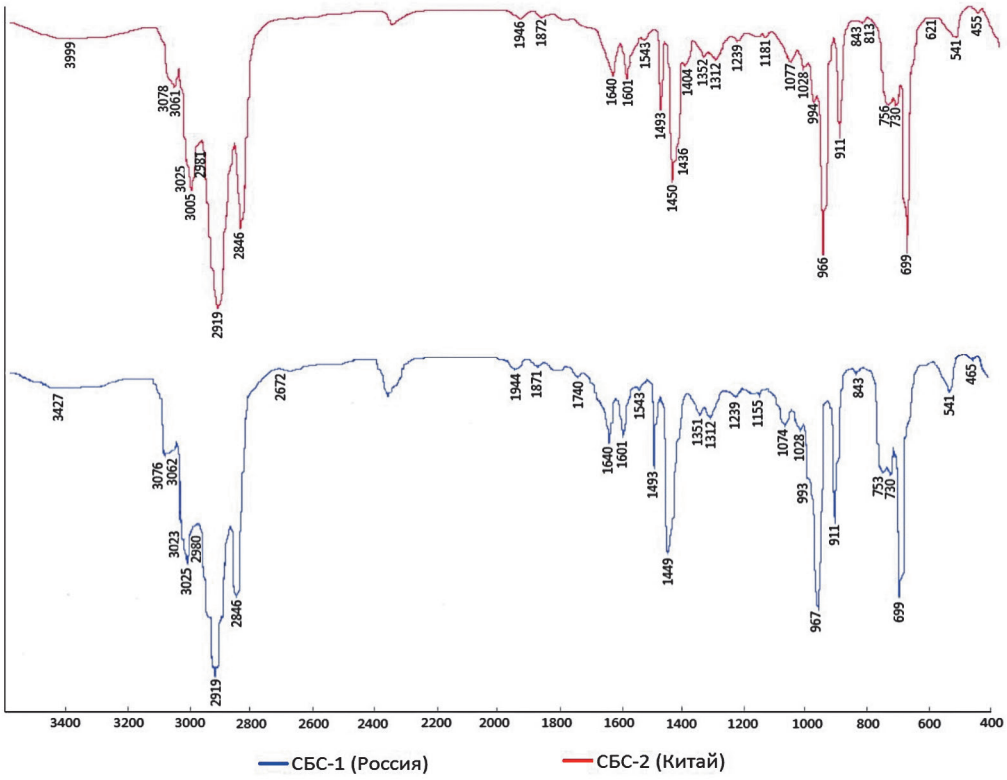
[1] ГОСТ Р 52056-2003. Вяжущие полимерно-битумные дорожные на основе блоксополимеров типа стирол – бутадиен – стирол. Технические условия. М.: Госстандарт России, 2003. 8 с.

[2] ГОСТ 33137-2014. Дороги автомобильные общего пользования. Битумы нефтяные дорожные вязкие. Метод определения динамической вязкости ротационным вискозиметром. Метод определения дина-мической вязкости ротационным вискозиметром. М.: Стандратинформ, 2019. 11 с.

Таблица 2. Состав сополимеров на основе стирола и бутадиена

Table 2. Composition of styrene and butadiene-based copolymers

Сополимер	Страна-производитель	Состав сополимера	
		Стирольных звеньев, мол. %	Бутадиеновых звеньев, мол. %
СБС-1	Россия	79,42	20,58
СБС-2	Китай	36,09	63,91



ИК-спектры сополимеров

IR spectra of copolymers

1. К предварительно нагретому битуму при перемешивании одновременно добавили СБС и пластификатор и далее осуществляли перемешивание в течение 6 ч.

2. В заранее подготовленную смесь СБС и пластификатора ввели предварительно нагретый битум и далее осуществляли перемешивание в течение 6 ч.

В ходе исследования были проанализированы полученные образцы модифицированных битумов, приготовленных различными способами.

Из данных, представленных в табл. 3, видно, что при увеличении процентного содержания сополимера в нефтяном дорожном битуме динамическая вязкость и значение

Таблица 3. Результаты лабораторных исследований при одновременном добавлении в битум сополимера на основе стирола и бутадиена и пластификатора И-40

Table 3. Laboratory test results with simultaneous addition of bitumen, copolymer (SBS) and plasticizer I-40

Содержание сополимера, %	Страна-производитель	Динамическая вязкость при 135 °С, Па×с	Температура размягчения КиШ*, °С	Температура хрупкости, °С	Пенетрация 25 °С, 0,1 мм	Растяжимость 25 °С, см
1	Россия	0,23	43,2	-32	140	32
2	Россия	0,27	50,8	-36	193	33
3	Россия	0,28	44,1	-38	198	36
1	Китай	0,27	43,8	-32	124	58
2	Китай	0,27	49,2	-36	228	71
3	Китай	0,28	52,5	-38	232	72

Примечание. * – здесь и в табл. 4 имеется в виду метод определения температуры размягчения по кольцу и шару, описанный в ГОСТ 11506-73[3].

[3] ГОСТ 11506-73. Битумы нефтяные. Метод определения температуры размягчения по кольцу и шару. М.: Стандартинформ, 2009. 8 с.

Таблица 4. Результаты лабораторных исследований при добавлении в битум заранее подготовленной смеси сополимера на основе стирола и бутадиена и пластификатора И-40

Table 4. Laboratory test results when a pre-prepared mixture of copolymer (SBS) and plasticizer (I-40) was added to bitumen

Содержание сополимера, %	Страна-производитель	Динамическая вязкость при 135 °С, Па×с	Температура размягчения КиШ, °С	Температура хрупкости, °С	Пенетрация 25 °С, 0,1 мм	Растяжимость 25 °С, см
1	Россия	0,26	43,6	-30	144	–
2	Россия	0,27	52,1	-37	195	35
3	Россия	0,28	43,2	-38	197	31
1	Китай	0,28	44,9	-34	125	65
2	Китай	0,29	50,9	-36	233	77
3	Китай	0,30	52,6	-36	221	74

растяжимости полимерно-битумных вяжущих возрастают, а температура его хрупкости понижается. С увеличением содержания бутадиеновых звеньев в сополимере динамическая вязкость, температура размягчения, температура хрупкости, значения пенетрации и растяжимости возрастают, причем для СБС-2 данные значения выше, чем для СБС-1.

Установлено, что предварительное смешение сополимера с пластификатором с последующим добавлением этой смеси в нефтяной дорожный битум повышает все изученные характеристики полимерно-битумных вяжущих. Это указывает на равномерное распределение сополимеров в битуме и на образование более стабильной композиции (табл. 4). Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод, что способ подготовки исходной смеси также влияет на физико-механические характеристики полимерно-битумных вяжущих.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при увеличении процентного содержания сополимера СБС в нефтяном дорожном битуме динамическая вязкость и значение растяжимости полимерно-битумных вяжущих возрастают, а температура его хрупкости понижается. С повышением содержания бутадиеновых звеньев в сополимере СБС динамическая вязкость, температура размягчения, температура хрупкости, значения пенетрации и растяжимости возрастают. Предварительное смешение сополимеров СБС с пластификатором с последующим добавлением смеси в битум способствует равномерному распределению сополимеров и тем самым обеспечивает стабильность полимерно-битумных вяжущих.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Polacco G., Filippi S., Merusi F., Stasta G. A review of the fundamentals of polymer-modified asphalts: asphalt/polymer interactions and principles of compatibility //Advances in Colloid and Interface Science. 2015. Vol. 224. P. 72–112. DOI: 10.1016/j.cis.2015.07.010.

2. Брызгалов Н.И., Кемалов А.Ф., Кемалов Р.А. Влияние бутадиен-стирольного термоэластопласта на физико-химические показатели полимер-битумных вяжущих // Вестник технологического университета. 2022. Т. 25. N 9. С. 76–84. DOI: 10.55421/1998-7072_2022_25_9_76. EDN: JCAHEO.

3. Лукин А.С., Житов Р.Г., Баяндин В.В., Шаглаева Н.С. Исследование влияния природы пластификатора на свойства полимер-битумных композиций методом флуоресцентной микроскопии // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12. N 3. С. 471–478. DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-3-471-478. EDN: ZMVOML.

4. Chen S., Jin E., Xu G., Zhuo S., Chen X. Factors influencing the low-temperature properties of styrene-butadiene-styrene modified asphalt based on orthogonal tests // Polymers. 2023. Vol. 15, no. 1. P. 52. DOI: 10.3390/polym15010052.

5. Jexembayeva A., Konkanov M., Aruova L., Kirgizbayev A., Zhaksylykova L. Modifying bitumen with recycled PET plastics to enhance its water resistance and strength characteristics // Polymers. 2024. Vol. 16, no. 23. P. 3300. DOI: 10.3390/polym16233300.

6. Airey G.D. Styrene butadiene styrene polymer modification of road bitumens // Journal of Materials Science. 2004. Vol. 39, no. 3. P. 951–959. DOI: 10.1023/B:JMSC.0000012927.00747.83.

7. Zhitov R.G., Kizhnyaev V.N., Shirokov V.V. Copolymerization of styrene with methacrylates in petroleum bitumen and properties of resulting composites // Theoretical Foundations of Chemical Engineering. 2019. Vol. 53. P. 860–863. DOI: 10.1134/S0040579518050305.

8. Yu H., Jin Y., Liang X., Dong F. Preparation of waste-LDPE/SBS composite high-viscosity modifier and its effect on the rheological properties and microstructure of asphalt // Polymers. 2022. Vol. 14, no. 18. P. 3848. DOI: 10.3390/polym14183848.

9. Liu K., Xu Y., Wang H., Wang L. Experimental and molecular dynamics study on the properties of amorphous poly alpha olefin (APAO)reinforcing styrene butadiene rubber (SBR) modified asphalt // Construction and Building Materials. 2024. Vol. 443. P. 137844. DOI: 10.1016/j.conbuildmat.2024.137844.

10. Евдокимова Н.Г., Егорова Н.А., Султанова Д.П., Кунаккулова Э.М., Сережкина Н.Г. Формирование золь-гелевой наноструктуры дорожных битумов методом подбора группового химического состава // Нанотехнологии в строительстве: научный Интернет-журнал. 2019. Т. 11. N 5. С. 512–525. DOI: https://doi.org/10.15828/2075-8545-2019-11-5-512-525. EDN: KPPGIH.

11. Высоцкая М.А., Кузнецов Д.А., Литовченко Д.П., Барковский Д.В., Ширяев А.О. Пластификатор при производстве полимерно-битумных вяжущих – как необходимость // Вестник Белгородского государственного технологического университета им. В.Г. Шухова. 2019. N 5. С. 16–22. DOI: 10.34031/article_5cd6df466bb9e0.32764094. EDN: VRPVEJ.

12. Алексеев А.А., Лобанов А.В., Осипчик В.С., Жуков А.Ф., Алексеев А.А. Пластификация индустриальным

маслом бутадиен-стирольного блок-сополимера с повышенным содержанием стирола // Известия высших учебных заведений. Серия Химия и химическая технология. 2013. Т. 56. N 8. С. 85–89. EDN: QZESWJ.

13. Беляев П.С., Полушкин Д.Л., Макеев П.В., Фролов В.А. Модификация нефтяных дорожных битумов полимерными материалами для получения асфальтобетонных покрытий с повышенными эксплуатационными характеристиками // Вестник Тамбовского государственного технического университета. 2016. Т. 22. N 2. С. 264–271. DOI: 10.17277/vestnik.2016.02.pp.264-271. EDN: VWDSXH.

14. Zhang F., Yu J., Wu S. Effect of ageing on rheological properties of storage-stable SBS/sulfur-modified asphalts // Journal of Hazardous Materials. 2010. Vol. 182, no. 1-3. P. 507–517. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.06.061.

15. Bansal S., Gupta V., Chopra T., Mehta R. Styrene-Butadiene-Styrene polymer modified bitumen: a review on compatibility and physico-chemical properties // Physica Scripta. 2024. Vol. 99. P. 122001. DOI: 10.1088/1402-4896/ad9113.

16. Liu K., Liu Y., Wang X., Dong L., Wang P. Evolution in thermal storage stability of SBS-polymer modified asphalt induced by differences in microscopic characteristics of base asphalt // Journal of Adhesion Science and Technology. 2024. P. 1–26. DOI: 10.1080/01694243.2024.2430655.

17. Гохман Л.М. Выбор полимера и приготовление ПБВ // Автомобильные дороги. 2016. N 2. С. 55–61.

18. Dong F., Zhao W., Zhang Y., We J., Fan W., Yu Y., et al. Influence of SBS and asphalt on SBS dispersion and the performance of modied asphalt // Construction and Building Materials. 2014. Vol. 62. P. 1–7. DOI: 10.1016/j.conbuildmat.2014.03.018.

19. Chen M., Geng J., Xia C., He L., Liu Z. A review of phase structure of SBS modified asphalt: Affecting factors, analytical methods, phase models and improvements // Construction and Building Materials. 2021. Vol. 294. P. 123610. DOI: 10.1016/j.conbuildmat.2021.123610.

20. Zhou S., Wang J., Li S., Yan C. Investigating the rheological behaviour of styrene-butadiene-styrene modified asphalt // Road Materials and Pavement Design. 2023. Vol. 25, no. 9. P. 1964–1979. DOI: 10.1080/14680629.2023.2287715.

21. Li L., Huang C., Zeng Xu., Yang H., Gao W., Chen Y., et al. Rheological performance and UV aging resistance of buton rock asphalt and styrene-butadiene-styrene composite modified asphalt under high temperature // Coatings. 2024. Vol. 14, no. 12. P. 1589. DOI: 10.3390/coatings14121589.

22. Dong F., Zhao W., Zhang Y., Fan W., Wei J., Luo H., et al. High-temperature performance and microstructure of composite modified hard asphalt // Petroleum Science and Technology. 2018. Vol. 36, no. 7. P. 481–486. DOI: 10.1080/10916466.2014.919006.

23. Баданов С.В., Урумов А.В., Баяндин В.В., Шаглаева Н.С. Реакционная способность 2,3-дихлорпропена в реакциях радикальной сополимеризации // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 517–522. DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-4-517-522. EDN: GHSPJJ.

REFERENCES

1. Polacco G., Filippi S., Merusi F., Stasta G. A review of the fundamentals of polymer-modified asphalts: asphalt/polymer interactions and principles of compatibility. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2015;224:72-112. DOI: 10.1016/j.cis.2015.07.010.

2. Bryzgalov N.I., Kemalov A.F., Kemalov R.A. Influence of butadiene styrene thermoplastic elastomer on physico-chemical parameters of polymer-bitumen binders. *Herald of Technological University*. 2022;25(9):76-84. (In Russian). DOI: 10.55421/1998-7072_2022_25_9_76. EDN: JCAHEO.

3. Lukin A.S., Zhitov R.G., Bayandin V.V., Shaglaeva N.S. Study into the effect of plasticizer nature on the properties of polymer-bitumen compositions via fluorescence microscopy. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2022;12(3):471-478. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2022-12-3-471-478. EDN: ZMVOML.

4. Chen S., Jin E., Xu G., Zhuo S., Chen X. Factors influencing the low-temperature properties of styrene-butadiene-styrene modified asphalt based on orthogonal tests. *Polymers*. 2023;15(1):52. DOI: 10.3390/polym15010052.

5. Jexembayeva A., Konkanov M., Aruova L., Kirgizbayev A., Zhaksylykova L. Modifying bitumen with recycled PET plastics to enhance its water resistance and strength characteristics. *Polymers*. 2024;16(23):3300. DOI: 10.3390/polym16233300.

6. Airey G.D. Styrene butadiene styrene polymer modification of road bitumens. *Journal of Materials Science*. 2004;39(3):951-959. DOI: 10.1023/B:JMSC.0000012927.00747.83.

7. Zhitov R.G., Kizhnyaev V.N., Shirokov V.V. Copolymerization of styrene with methacrylates in petroleum bitumen and properties of resulting composites. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 2019;53:860-863. DOI: 10.1134/S0040579518050305.

8. Yu H., Jin Y., Liang X., Dong F. Preparation of waste-LDPE/SBS composite high-viscosity modifier and its effect on the rheological properties and microstructure of asphalt. *Polymers*. 2022;14(18):3848. DOI: 10.3390/polym14183848.

9. Liu K., Xu Y., Wang H., Wang L. Experimental and molecular dynamics study on the properties of amorphous poly alpha olefin (APAO)reinforcing styrene butadiene rubber (SBR) modified asphalt. *Construction and Building Materials*. 2024;443:137844. DOI: 10.1016/j.conbuildmat.2024.137844.

10. Evdokimova N.G., Egorova N.A., Sultanova D.P., Kunakkulova E.M., Serezhkina N.G. The formation of the sol-gel nanostructures of road bitumen by selecting chemical group composition. *Nanotechnologies in Construction: a Scientific Internet-Journal*. 2019;11(5):512-525. (In Russian). DOI: https://doi.org/10.15828/2075-8545-2019-11-5-512-525. EDN: KPPGIH.

11. Vysotskaya M., Kuznecov D., Litovchenko D., Barkovskiy D., Shiryaev A. The need for a plasticizer in the production of polymeric-bitumen binders. *Bulletin of Belgorod State Technological University Named after V.G. Shukhov*. 2019;5:16-22. (In Russian). DOI: 10.34031/article_5cd6df466bb9e0.32764094. EDN: VRPVEJ.

12. Alekseev A.A., Lobanov A.V., Osipchik V.S., Zhukov A.F., Alekseev A.A. Butadiene-styrene block copolymer plasticization with industrial oil of increased styrene content. *ChemChemTech*. 2013;56(8):85-89. (In Russian). EDN: QZESWJ.

13. Belyaev P.S., Polushkin D.L., Makeev P.V., Frolov V.A. Petroleum bitumen modified by polymer materials for asphalt concrete surfacing with improved operational performance. *Vestnik Tambovskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta*. 2016;22(2):264-271. (In Russian). DOI: 10.17277/vestnik.2016.02.pp.264-271. EDN: VWDSXH.

14. Zhang F., Yu J., Wu S. Effect of ageing on rheological

properties of storage-stable SBS/sulfur-modified asphalts. *Journal of Hazardous Materials*. 2010;182(1-3):507-517. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.06.061.

15. Bansal S., Gupta V., Chopra T., Mehta R. Styrene-Butadiene-Styrene polymer modified bitumen: a review on compatibility and physico-chemical properties. *Physica Scripta*. 2024;99:122001. DOI: 10.1088/1402-4896/ad9113.

16. Liu K., Liu Y., Wang X., Dong L., Wang P. Evolution in thermal storage stability of SBS-polymer modified asphalt induced by differences in microscopic characteristics of base asphalt. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 2024:1-26. DOI: 10.1080/01694243.2024.2430655.

17. Gokhman L.M. Selection of polymer and preparation of polymer-bitumen binder. *Avtomobil'nye dorogi*. 2016;2:55-61.

18. Dong F., Zhao W., Zhang Y., We J., Fan W., Yu Y., et al. Influence of SBS and asphalt on SBS dispersion and the performance of modied asphalt. *Construction and Building Materials*. 2014;62:1-7. DOI: 10.1016/j.conbuildmat.2014.03.018.

19. Chen M., Geng J., Xia C., He L., Liu Z. A review of phase structure of SBS modified asphalt: Affecting factors, analytical methods, phase models and improvements. *Construction and Building Materials*. 2021;294:123610. DOI: 10.1016/j.conbuildmat.2021.123610.

20. Zhou S., Wang J., Li S., Yan C. Investigating the rheological behaviour of styrene-butadiene-styrene modified asphalt. *Road Materials and Pavement Design*. 2023;25(9):1964-1979. DOI: 10.1080/14680629.2023.2287715.

21. Li L., Huang C., Zeng Xu., Yang H., Gao W., Chen Y., et al. Rheological performance and UV aging resistance of buton rock asphalt and styrene-butadiene-styrene composite modified asphalt under high temperature. *Coatings*. 2024;14(12):1589. DOI: 10.3390/coatings14121589.

22. Dong F., Zhao W., Zhang Y., Fan W., Wei J., Luo H., et al. High-temperature performance and microstructure of composite modified hard asphalt. *Petroleum Science and Technology*. 2018;36(7):481-486. DOI: 10.1080/10916466.2014.919006.

23. Badanov S.V., Urumov A.V., Bayandin V.V., Shaglaeva N.S. Reactivity of 2,3-dichloropropene in free-radical copolymerization reactions. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):517-522. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-4-517-522. EDN: GHSPJJ.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Кривошеин Андрей Александрович,
аспирант,
Иркутский национальный исследовательский технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ andrey.krivoshein.97@mail.ru
https://orcid.org/0009-0009-5257-4093

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

Вклад авторов

А.А. Кривошеин – проведение исследования.
Н.С. Шаглаева – курирование данных.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 14.01.2025.
Одобрена после рецензирования 01.04.2025.
Принята к публикации 31.05.2025.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Andrey A. Krivoshein,
Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ andrey.krivoshein.97@mail.ru
https://orcid.org/0009-0009-5257-4093

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

Contribution of the authors

Andrey A. Krivoshein – investigation.
Nina S. Shaglaeva – data curation.

Conflict of interest

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 14.01.2025.
Approved after reviewing 01.04.2025.
Accepted for publication 31.05.2025.

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 66.081.6
EDN: UADNVO
DOI: 10.21285/achb.972

Электрокинетические характеристики электродеионизационной очистки и концентрирования технологических растворов гальванических производств, содержащих ионы кобальта, меди и кадмия

С.И. Лазарев, И.В. Хорохорина, М.И. Михайлин, О.С. Филимонова✉

Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Российская Федерация

Аннотация. *Данное исследование посвящено изучению электрохимических и электрокинетических характеристик электродеионизационного извлечения ионов кобальта, меди и кадмия из технологических растворов гальванических производств для повторного использования. С целью обоснования выбора объектов исследования выполнен литературный обзор материалов на тему возможности использования электромембранных методов для очистки и концентрирования стоков промышленных производств. В ходе работы проведены экспериментальные исследования вольт-амперных характеристик процесса электродеионизации. Отмечено, что на кривых наблюдается минимальный линейный омический участок при напряжении от 1 до 3 В, на участке от 3 до 5 В – плато с небольшим уклоном вверх. При дальнейшем увеличении напряжения отмечается область сверхпредельного тока, обусловленная образованием на границах раздела мембрана – ионообменная смола ионов* H^+ *и* OH^-*. Проанализированы кинетические зависимости концентраций задерживаемых веществ от времени в камерах концентрирования и обессоливания электродеионизационного аппарата при разных плотностях тока и расходах. При низкой плотности тока 5 А/м*^{2} *отмечено три основных участка: первый – в диапазоне от 0 до 900 с, обусловленный накоплением ионов на ионитах в камерах обессоливания и концентрирования; второй – в диапазоне от 900 до 2700 с, где наблюдается интенсивный перенос ионов; третий – в диапазоне от 2700 до 3600 с, в котором происходит электрохимическая регенерация ионитов в камерах очистки. По результатам разработана технологическая схема очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов.*

Ключевые слова: *ионообменная мембрана, смола, кинетическая зависимость, вольт-амперные характеристики, обменная емкость, выходной поток, ионы металлов*

Финансирование. *Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках проекта «Теоретические и экспериментальные исследования электрокинетических и структурных характеристик полимерных мембран посредством применения искусственных нейронных сетей в процессах электромембранной очистки промышленных растворов, содержащих ионы металлов» (FEMU-2024-0011).*

Для цитирования: Лазарев С.И., Хорохорина И.В., Михайлин М.И., Филимонова О.С. Электрокинетические характеристики электродеионизационной очистки и концентрирования технологических растворов гальванических производств, содержащих ионы кобальта, меди и кадмия // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 269–278. DOI: 10.21285/achb.972. EDN: UADNVO.

© Лазарев С.И., Хорохорина И.В., Михайлин М.И., Филимонова О.С., 2025

CHEMICAL TECHNOLOGY

Original article

Electrokinetic characteristics of electrodeionization purification and concentration of electroplating solutions containing cobalt, copper, and cadmium ions

Sergey I. Lazarev, Irina V. Khorokhorina, Maxim I. Mikhailin, Olga S. Filimonova✉

Tambov State Technical University, Tambov, Russian Federation

Abstract. *In this work, we investigate the electrochemical and electrokinetic characteristics of electrodeionization extraction of cobalt, copper, and cadmium ions from process solutions of electroplating plants for subsequent recycling. The research objects were selected following a review of publications on the possibility of using electromembrane methods for purification and concentration of industrial wastes. The current–voltage characteristics of the electrodeionization process were studied experimentally. The I–V curves showed the presence of a minimal linear ohmic section at voltages from 1 to 3 V and a plateau with a slight upward slope at the section from 3 to 5 V. Under a further increase in voltage, a region of supercritical current is observed, which is related to the formation of* H^+ *and* OH^- *ions at the membrane–ion-exchange resin interfaces. The kinetic dependencies of the concentrations of retained substances on the residence time in the desalting and concentration chambers of the electrodeionization unit at different current densities and flow rates were analyzed. At a low current density of 5* A/m^2*, three main sections were observed: (1) in the range from 0 to 900 s, where ion accumulation on ion-exchange membranes in desalting and concentration chambers occurs; (2) in the range from 900 to 2700 s, where intensive ion transfer is observed; (3) in the range from 2700 to 3600 s, where electrochemical regeneration of ions in purification chambers takes place. The results obtained were used to develop a technological scheme for wastewater treatment from heavy metal ions.*

Keywords: *ion-exchange membrane, resin, kinetic dependence, volt-ampere characteristics, exchange capacity, output flux, metal ions*

Funding. *The work was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of the project "Theoretical and experimental studies of the electrokinetic and structural characteristics of polymer membranes through the use of artificial neural networks in the processes of electromembrane purification of industrial solutions containing metal ions" (FEMU-2024-0011).*

For citation: Lazarev S.I., Khorokhorina I.V., Mikhailin M.I., Filimonova O.S. Electrokinetic characteristics of electrodeionization purification and concentration of electroplating solutions containing cobalt, copper, and cadmium ions. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2):269-278. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.972. EDN: UADNVO.

ВВЕДЕНИЕ

В гальванических и металлообрабатывающих производствах образуются технологические растворы и сточные воды, утилизация которых затруднена из-за их большого количества и различной концентрации ионов цветных металлов в них [1]. Хочется отметить, что две трети цветных металлов, содержащихся в технологических растворах и сточных водах, безвозвратно уносится со стоками. Этот немаловажный фактор говорит о необходимости извлечения цветных металлов из растворов для их повторного использования в гальванопокрытиях и металлообрабатывающих производствах.

Перспективными методами концентрирования и очистки промышленных стоков являются мембранные методы, затраты энергии в которых сведены к минимальным термодинамическим, используемым только на разрыв межмолекулярных связей. В то же время для эффективного применения электромембранных методов в технологии концентрирования или очистки стоков необходимо владеть знаниями по изменению электрокинетических характеристик в зависимости от режимных и технологических параметров. Так, авторы работы [2] на пилотной установке определили основные параметры электромембранного процесса извлечения ионов кадмия из сульфатно-аммонийного электролита кадмирования с высокими эксплуатационными характеристиками и ванны промывки кадмированных деталей в непроточной воде (ванны улавливания). В данном материале показано, что степень извлечения в стационарных условиях составляет около 99%, что соответствует значениям, полученным с другими сульфатно-аммонийными электролитами кадмирования, и позволяет рекомендовать исследуемый электролит для использования в промышленности. В исследованиях, представленных в работе [3], рассмотрен анализ двух процессов: электродиализа и электродеионизации, изучены динамика и закономерности протекания процессов при обработке исследуемого модельного раствора, оценена эффективность процессов и проведена сравнительная оценка. В статье [4] разработана методика расчета электродеионизационного плоскокамерного аппарата для извлечения ионов тяжелых металлов из технологических

растворов. Авторы работы [5] описали технологические предпосылки электроосмотических процессов опреснения воды, обобщили свои прошлые и текущие попытки масштабирования и коммерциализации методов, провели критический обзор преимуществ и ограничения таких методов. В статье [6] авторами измерены выходы по току продуктов диссоциации воды и сняты вольт-амперные характеристики асимметричных биполярных мембран в двухкамерной электрохимической ячейке, образованной биполярной мембраной МБ-3 и гетерогенными монополярными мембранами МА-40 и МА-41. В ходе работы установлено, что диссоциация воды на монополярной мембране МА-40 в 0,01 М растворе хлорида натрия приводит к снижению выхода по току кислоты и щелочи как в канале с биполярной, так и в канале с асимметричной биполярной мембраной, определены эффективные числа переноса ионов через монополярные мембраны МА-40 и МА-41 при различных значениях pH. Авторами материала [7] исследовано электродиализное разделение растворов. Выявлено, что при разделении многокомпонентного раствора, содержащего сразу три соли, наблюдается снижение значений коэффициентов задержания катионов Ni^{2+} и Cu^{2+} по сравнению с соответствующими односолевыми растворами. Установлено, что применение электродиализа для разделения многокомпонентных растворов с целью дальнейшего восстановления металлов наиболее эффективно по катионам Fe^{3+} и Cu^{2+}. Авторы исследования [8] разработали новую технологию емкостной деионизации – электродеионизации с использованием механизма координации электромиграции, электроадсорбции и ионного обмена. Благодаря этому методу можно эффективно удалять ионы тяжелых металлов с низким содержанием в сточных водах с высокой минерализацией. Технология оптимизирована за счет уменьшения количества ионообменных мембран с 4 до 2 без потери эффективности, что позволило снизить стоимость установки.

В работе [9] описан массоперенос ионов через ионообменные мембраны. В ней исследовали числа переноса, а также потоки ионов соли и ионов среды, образующиеся при превышении предельно диффузионного тока. В работе [10] исследовано влияние разности потенциалов приложенной к электродам скорости потока литийсодержащего раствора, наличия сопутствующих ионов (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Ba^{2+} и Mg^{2+}), а также влияние концентрации электролита в анодной и катодной камерах на удаление Li^+. При напряжении 20 В из литийсодержащего раствора было удалено 99% Li^+. Авторы исследования [11] разработали новые биоразлагаемые протонообменные мембраны для твердополимерных топливных элементов, полученные на основе сшитого сульфоянтарной кислотой поливинилового спирта, допированного частицами цеолита типа BEA. Содержание цеолита в составе мембран варьировали в интервале от 1 до 25%. Повышение содержания цеолита от 1 до 25% приводит к увеличению ионообменной емкости мембран от 1,5 до 2,9 ммоль/г, понижению влагосодержания с 38 до 28% и проницаемости по метанолу от $2{,}27\times10^{-6}$ до $6{,}91\times10^{-7}$ $см^2\times с^{-1}$. Ими также изучена температурная зависимость протонной проводимости композитных мембран в диапазоне от 30 до 80 °C при относительной влажности 100%. Наибольшее значение удельной электропроводности продемонстрировала мембрана, содержащая 25% цеолита BEA, протонная проводимость которой составила 23,2 $мСм\times см^{-1}$.

В материале [12] описан новый электромембранный метод переработки технологических солевых растворов сложного состава с получением концентрированных растворов азотной кислоты (до 750 г/л) и щелочей (до 600 г/л NaOH и KOH), пригодных для повторного и самостоятельного использования. В исследовании [13] описан опыт использования электродиализа для переработки органо-минеральных сточных вод химической промышленности, позволивший создать безотходные производства и снизить техногенную нагрузку на окружающую среду. Авторами работы [14] изучена возможность применения углеродных сорбентов, обладающих микропористой структурой, для извлечения марганца из водных растворов. В статье [15] проведен анализ перспективных направлений использования и развития электродиализа. Для интенсификации процесса предложено использовать различные токовые режимы (например, пульсирующие токи).

Выполненный анализ материалов [1–15] позволил оценить состояние проблемы и сформулировать цель предстоящего исследования. В связи с вышесказанным проведенная работа была посвящена изучению электрохимических и электрокинетических характеристик электродеионизационного извлечения ионов кобальта, меди и кадмия из технологических растворов гальванических производств для повторного использования в процессе производства.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальные исследования электродеионизационного разделения проводили на минерализованных модельных растворах гальванических производств, содержащих сульфаты меди ($CuSO_4$), кадмия ($CdSO_4$) и кобальта ($CoSO_4$). В качестве объектов исследования использовались ионообменные мембраны производства отечественной компании «Щекиноазот» марок МК-40 и МА-41П, а также ионообменные смолы отечественной компании «Токем» марок КУ-2-8 и АВ-17-8. В табл. 1 и 2 представлены технические характеристики ионообменных мембран МК-40 и МА-41П и обменных смол КУ-2-8 ЧС и АВ-17-8 ЧС [16].

Выбор веществ для исследования обусловлен тем, что медь, кобальт, кадмий и их соединения являются токсичными и относятся ко II и III классам опасности. К предельно допустимым концентрациям (ПДК) этих химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования предъявляются жесткие требования. Так, ПДК для ионов Cu^{2+} составляет 1 мг/л, Co^{2+} – 0,1 мг/л, Cd^{2+} – 0,015мг/л[1]. Данные тяжелые металлы не поддаются разложению, обладают высокой

[1] Об утверждении Правил холодного водоснабжения и водоотведения и о внесении изменений в некоторые акты Правительства Российской Федерации: постановление Правительства Российской Федерации от 29 июля 2013 г. № 644 (ред. от 28 ноября 2023 г.) // КонсультантПлюс. Режим доступа: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_150474/d4c6cb4e5630ac0fbc8c7ff7aba49e22c1cca718/ (дата обращения: 13.12.2024).

Таблица 1. Технические характеристики ионообменных мембран

Table 1. Technical characteristics of ion exchange membranes

Марка мембраны	Прочность при разрыве, МПа	Изменение размеров при набухании в водной среде, %		Поверхностное электрическое сопротивление, Ом×см^2	Числа переноса	Материал
		по длине	по толщине			
МК-40	16,3	8	27	9,9	0,93	Сополимер полисульфона с дивинилбензолом
МА-41П	16,1	8	25	7,3	0,92	Сополимер полистирола с дивинилбензолом

Таблица 2. Технические характеристики ионообменных смол

Table 2. Technical characteristics of ion exchange resins

Марка смолы	Размер гранул/зерен, мм	Динамическая обменная емкость, моль/м^3	Массовая доля влаги, %	Осмотическая стабильность, %
КУ-2-8 ЧС	0,315–1,250	Более 526 моль/м^3	48–58	Не менее 94,5
АВ-17-8 ЧС	0,40–1,25	Более 1050 моль/м^3	35–50	Более 91

токсичностью и легко накапливаются, поэтому очистка растворов от этих ионов является важной задачей для обеспечения безопасности, защиты окружающей среды и здоровья человека. С экономической точки зрения выделение и концентрирование ионов Cu^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} из сточных вод может быть выгодным [17], так как они являются одними из наиболее ценных металлов и могут повторно использоваться в различных отраслях промышленности.

Для проведения электрохимических и электрокинетических исследований была спроектирована экспериментальная установка электродеионизационного вида, подробно описанная в работах [4, 16]. Перед началом эксперимента проводилась активация ионообменных мембран, которая необходима для вытеснения всех неизвестных ионов из ионообменной структуры мембраны, насыщения ионообменных групп нужными ионами, а также для возобновления характеристик мембран.

Для подготовки ионообменной смолы использовалась методика, включающая следующие шаги [18]:

1. В одну емкость помещали катионообменную смолу, в другую – анионообменную.
2. Обе емкости заполняли раствором 4%-го хлорида натрия и оставляли на 4 ч для насыщения смол ионами Na^+ и Cl^-. Раствор обновляли два раза. Такая концентрация хлорида натрия была выбрана для предотвращения повреждения смолы из-за осмотического шока, вызванного интенсивным обменом ионами.
3. Смолу промывали деионизованной водой до тех пор, пока электропроводимость не стала равной 5–10 мкСм/см для каждой смолы.
4. Анионообменную смолу обрабатывали 2%-м раствором гидроксида натрия, катионообменную – 2%-м раствором соляной кислоты. Иониты оставляли на 4 ч при условии периодического перемешивания раствора.
5. При хранении ионитов для предотвращения их окисления и высыхания смолы заливали рабочим раствором и хранили их только под слоем водного раствора.

Исследования вольт-амперных характеристик проводились на экспериментальном стенде, описанном в работе [16]. Исследовался модельный раствор, имитирующий промывочные воды гальванических производств. Концентрации ионов Cu^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} составляли 25 мг/л. На электроды подавалось постоянное напряжение от 0 до 60 В. Для регистрации показаний амперметра и вольтметра использовалось специальное устройство, которое записывало данные с интервалом в 20 с. В ходе эксперимента расход модельного раствора составлял 0,8 л/мин. Благодаря этому было возможно проводить 10 циклов замены раствора в камерах в течение 1 мин, что позволяло получить более точные данные о вольт-амперной характеристике, поскольку слабоминерализованным растворам свойственна низкая электропроводность и, следовательно, малая плотность тока.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вольт-амперные характеристики процесса электродеионизации важны для оценки ее эффективности и производительности, а также теоретического описания электромембранного процесса [19].

Вольт-амперные характеристики системы мембрана МК-40 – раствор – мембрана МА-41П представлены на рис. 1.

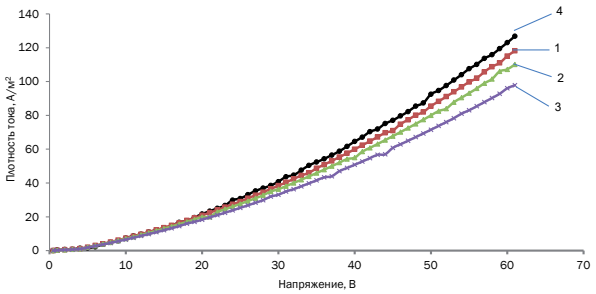


Рис. 1. Вольт-амперные характеристики процесса электродеионизации системы мембрана МК-40 – раствор – мембрана МА-41П: 1 – Cu^{2+}; 2 – Co^{2+}; 3 – Cd^{2+}; 4 – Cu^{2+}+Co^{2+}+Cd^{2+}

Fig. 1. Voltampere characteristics of the electrodeionization process of the MK-40 membrane – solution – MA-41P membrane system: 1 – Cu^{2+}; 2 – Co^{2+}; 3 – Cd^{2+}; 4 – Cu^{2+}+Co^{2+}+Cd^{2+}

На графиках зависимости напряжения от плотности тока наблюдается минимальный линейный омический участок на напряжении от 1 до 3 В, на участке от 3 до 5 В – плато с небольшим уклоном вверх. При дальнейшем увеличении напряжение отмечается область сверхпредельного тока, обусловленная образованием на границах раздела мембрана – ионообменная смола ионов H^+ и OH^-, которые увеличивают миграцию ионов через систему электрод – ионообменные смолы – мембрана – ионообменные смолы – мембрана – электрод. Это, в свою очередь, ведет к увеличению эффективной площади поверхности системы мембрана – ионообменная смола, происходит снижение электрического сопротивления системы. Область сверхпредельного тока характеризует процесс электровосстановления ионообменных смол до их обменных групп H^+ и OH^- [20].

Ионообменные смолы находились в камерах обессоливания и концентрирования в смешанном состоянии. Для разделения смолы на катионит и анионит был использован гравитационный метод, основанный на разности плотности ионитов. После осаждения и разделения смол были отобраны пробы катионита и анионита для анализа.

Образцы ионообменных материалов были подготовлены и исследованы методом кислотно-основного титрования.

Данные полной и остаточной емкости мембран и ионообменных смол представлены в табл. 3. Из таблицы видно, что емкость анионообменной мембраны сократилась на 12,6%. Это обусловлено деградацией поверхностных слоев. Для катионообменной мембраны наблюдается еще бо́льшая потеря исходной емкости – на 43%, что обусловлено накоплением на поверхности мембраны солей тяжелых металлов, которые, в свою очередь, препятствуют проникновению ионов к ионообменным группам мембраны.

Иониты в отсеках для концентрирования также потеряли свои сорбционные свойства за счет накопления на сферической поверхности в зонах контакта раздела фаз ионит/ионит/раствор солей тяжелых металлов в связи с высокой концентрацией в камерах концентрирования. Анионит потерял 40,6%, а катионит уменьшил емкость на 50,6% от исходной.

Иониты в камере обессоливания имеют наименьшую степень деградации: для катионита – 9,9%, для анионита – 22%. Это связано с уникальной особенностью процесса электродеионизации. В камерах обессоливания электродеионизационной ячейки под воздействием электрического тока за счет электрической проводимости ионитов на границе контакта двух разно-полюсных ионитов происходит расщепление воды на катион H^+ и анион OH^-. Образованные катионы и анионы создают кислотную и щелочную среду вокруг шарика ионита и способствуют вытеснению абсорбированных ионов металлов и кислотных остатков с поверхности смолы и замещению их на катион H^+ и анион OH^-. Подобная реакция способствует регенерации ионитов и увеличению их срока службы [21].

В работе были проведены исследования зависимости концентрации ионов в многокомпонентном растворе, содержащем ионы Cu^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+}, от времени проведения процесса разделения при разных плотностях тока.

Результаты электродеионизационных исследований по изменению концентраций в камерах очистки и концентрирования приведены на рис. 2 и 3.

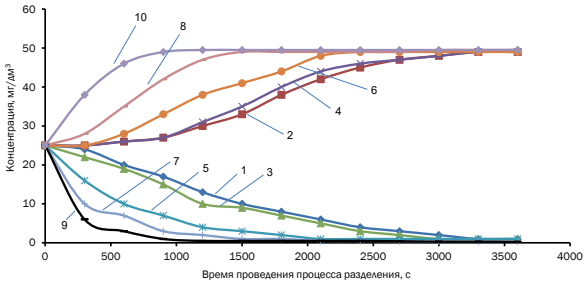


Рис. 2. Кинетические зависимости концентрации ионов Cu^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} от времени проведения процесса разделения в камерах концентрирования и обессоливания при разных плотностях тока при расходе 0,167 м³/с:
1 – дилюат при i = 5 А/м²; 2 – концентрат при i = 5 А/м²;
3 – дилюат при i =10 А/м²; 4 – концентрат при i = 10 А/м²;
5 – дилюат при i = 15 А/м²; 6 – концентрат при i = 15 А/м²;
7 – дилюат при i = 20 А/м²; 8 – концентрат при i = 20 А/м²;
9 – дилюат при i = 25 А/м²; 10 – концентрат при i = 25 А/м²

Fig. 2. Kinetic dependences of the concentration of Cu^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} ions on the time of the separation process in the concentration and desalination chambers at different current densities at a flow rate of 0,167 m³/s:
1 – diluate at i = 5 A/m²; 2 – concentrate at i = 5 A/m²;
3 – diluate at i = 10 A/m²; 4 – concentrate at i = 10 A/m²;
5 – diluate at i = 15 A/m²; 6 – concentrate at i = 15 A/m²;
7 – diluate at i = 20 A/m²; 8 – concentrate at i = 20 A/m²;
9 – diluate at i = 25 A/m²; 10 – concentrate at i = 25 A/m²

Таблица 3. Данные полной и остаточной емкости мембран и ионообменных смол

Table 3. Data on the total and residual capacity of membranes and ion exchange resins

Образец	Исходная емкость, ммоль/м³	Равновесная емкость, ммоль/м³	Остаточная емкость, ммоль/м³
МА-41П	1,11	1,01	0,97
МК-40	1,65	1,43	0,94
КУ-2-8 ЧС концентрированный	1,82	1,71	0,90
АВ-17-8 ЧС концентрированный	1,23	1,10	0,73
КУ-2-8 ЧС обессоленный	1,82	1,71	1,64
АВ-17-8 ЧС обессоленный	1,23	1,10	0,95

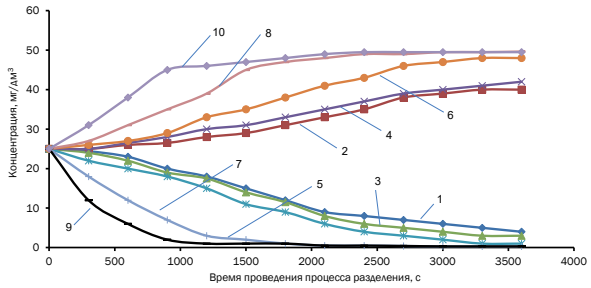


Рис. 3. Кинетические зависимости концентрации ионов Cu^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} от времени проведения процесса разделения в камерах концентрирования и обессоливания при разных плотностях тока при расходе 0,42 м³/с:
1 – дилюат при i = 5 А/м²; 2 – концентрат при i = 5 А/м²;
3 – дилюат при i = 10 А/м²; 4 – концентрат при i = 10 А/м²;
5 – дилюат при i = 15 А/м²; 6 – концентрат при i = 15 А/м²;
7 – дилюат при i = 20 А/м²; 8 – концентрат при i = 20 А/м²;
9 – дилюат при i = 25 А/м²; 10 – концентрат при i = 25 А/м²

Fig. 3. Kinetic dependences of the concentration of Cu^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} ions on the time of the separation process in the concentration and desalination chambers at different current densities at a flow rate of 0,42 m³/s:
1 – diluate at i = 5 A/m²; 2 – concentrate at i = 5 A/m²;
3 – diluate at i = 10 A/m²; 4 – concentrate at i = 10 A/m²;
5 – diluate at i = 15 A/m²; 6 – concentrate at i = 15 A/m²;
7 – diluate at i = 20 A/m²; 8 – concentrate at i = 20 A/m²;
9 – diluate at i = 25 A/m²; 10 – concentrate at i = 25 A/m²

На кинетических зависимостях при низкой плотности тока, равной 5 А/м², можно отметить три основных участка: первый – в диапазоне от 0 до 900 с, обусловленный накоплением ионов на ионитах в камерах обессоливания и концентрирования; второй – в диапазоне от 900 до 2700 с, где наблюдается интенсивный перенос ионов; третий – в диапазоне от 2700 до 3600 с, в котором происходит электрохимическая регенерация ионитов в камерах обессоливания [6, 22].

С увеличением плотности тока можно наблюдать, как изменяются эти временные диапазоны. Для плотности тока, равной 10 А/м², увеличивается скорость миграции ионов в камере обессоливания в связи с увеличением движущей силы. Для плотности тока 15 А/м² наблюдается смещение диапазона накопления до 420 с, диапазон интенсивного переноса находится в пределах 420–1800 с, диапазон электрохимической регенерации – в пределах 1800–3600 с. Для плотности тока 20 А/м² диапазон накопления отсутствует в связи с увеличением диссоциации воды и движущей силы. Диапазон интенсивного переноса соответствует значениям от 0 до 1500 с. Участок электрохимической регенерации имеет значения от 1500 до 3600 с. При плотности тока, равной 25 А/м², также отсутствует диапазон накопления ионов, при этом диапазон интенсивно переноса сократился до 900 с. После 900 с до конца эксперимента наблюдается диапазон электрохимического регенерации [23].

Выполненные экспериментальные исследования позволили разработать технологическую схему очистки сточных вод с применением электродеионизации [23, 24] (рис. 4). Модернизированная технологическая схема очистки гальваностоков после процессов омеднения, кадмирования и кобальтирования позволяет очищать и концентрировать промышленные растворы и сточные воды до уровней ПДК. Технологическая схема состоит из отстойника 1, флотатора 2, насосов 3, 9, фильтра грубой механической очистки 4, модуля электродеионизации 5, емкости для очищенной воды 6, баков 7 и 8 для хранения и последующей переработкой кислотного и щелочного концентрата, выпарного аппарата 10.

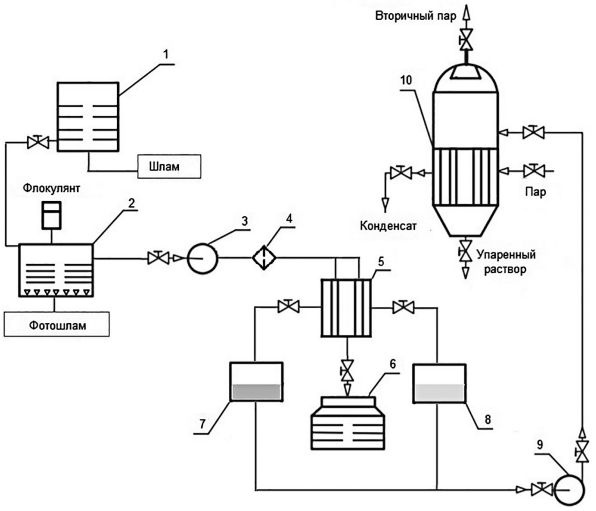


Рис. 4. Технологическая схема очистки промышленных растворов гальванических производств от ионов меди, кадмия и кобальта

Fig. 4. Technological scheme for the purification of industrial solutions of galvanic production from copper, cadmium and cobalt ions

Промышленные растворы поступают в отстойник 1, где из-за умеренного движения потока жидкости оседают нерастворимые вещества – песок, окалина, механические и другие примеси, которые, в свою очередь, отводятся в виде шлама, идущего на обезвреживание, за счет нейтрализации среды с последующей сублимацией. Из отстойника самотеком стоки попадают во флотатор 2, в который добавляются связывающие агенты – флокулянты. Образовавшийся флотошлам оседает в виде суспензии, состоящей из связанного флокулянта, и отводится из флотатора с последующим обезвреживанием и регенерацией флокулянта. Из флотатора осветленные стоки насосом 3 подаются на фильтр механической очистки 4. После флотации полученный слабоминерализированный раствор разделяется на два (дилюат и концентрат) и подается в модуль электродеионизации 5. В модуле электродеионизации под действием электрического тока происходит целенаправленное движение ионов солей растворенных веществ в камеры концентрирования и обессоливания. В свою очередь, из-за используемых ионообменных мембран в модуле происходит разделение раствора на три фазы: дилюат – очищенный раствор, поступающий в бак 6, который может быть повторно использован для приготовления технологических растворов; прикатодный концентрат, имеющий кислотную среду и поступающий в емкость 7; прианодный концентрат, имеющий щелочную среду и поступающий в емкость 8. Концентраты могут

раздельно использоваться в технологическом процессе или смешиваться для получения концентрированного солевого раствора, который затем с помощью насоса 9 поступает для дальнейшего концентрирования в выпарной аппарат 10. Сконцентрированный раствор в выпарном аппарате может повторно использоваться в процессе гальванопокрытий или высушиваться до сухого остатка в сушильных установках с целью применения в производстве строительных изделий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных экспериментальных исследований по концентрированию и очистке слабоминерализированных растворов методом электродеионизации со смешанным слоем катионита КУ-2-8 ЧС и анионита АВ-17-8 ЧС от сульфатов Cu^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} можно сделать следующие выводы:

1. Получены вольт-амперные характеристики процесса электродеионизации с применением мембран МА-41П, МК-40 и ионитного заполнения камер концентрирования и очистки смешанным слоем катионита КУ-2-8 ЧС и анионита АВ-17-8 ЧС при разделении растворов, содержащих сульфаты Cu^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+}. Определены экспериментальные данные по полной и остаточной емкости ионообменных мембран и ионообменных смол. Емкость анионообменной мембраны сокращается на 12,6%, а для катионообменной мембраны наблюдается еще бо́льшая потеря исходной емкости на 43%. Анионит теряет емкость на 40,6%, а катионит уменьшает емкость на 50,6% от исходной.

2. Проанализированы зависимости кинетических характеристик процесса электродеионизации при плотности тока от 5 до 25 А/м^2 и расхода раствора в камерах обессоливания и концентрирования от 0,167 до 0,420 м^3/с. На кинетических зависимостях отмечаются три участка: первый – в диапазоне от 0 до 900 с, обусловленный накоплением ионов на ионитах в камерах очистки и концентрирования; второй – в диапазоне от 900 до 2700 с, где наблюдается интенсивный перенос ионов; третий – в диапазоне от 2700 до 3600 с, в котором происходит электрохимическая регенерация ионитов в камерах очистки.

3. По результатам исследования разработана технологическая схема очистки и концентрирования промышленных растворов, содержащих сульфаты Cu^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+}. В результате разделения получается очищенный раствор и сконцентрированный раствор, который можно использовать в дальнейшем в процессе нанесения гальванических покрытий, а также в виде сухого остатка в производстве строительных изделий.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Li S., Dai M., Wu Y., Fu H., Hou X., Peng C., et al. Resource utilization of electroplating wastewater: obstacles and solutions // Environmental Science: Water Research & Technology. 2022. Vol. 8. P. 484–509. DOI: 10.1039/D1EW00712B.

2. Кругликов С С., Архипов Е.А., Жирухин Д.А., Смирнов К.Н., Ваграмян Т.А., Колесников В.А. [и др.]. Повышение эффективности электромембранных процессов на участке электрохимического кадмирования // Теоретические основы химической технологии. 2021. Т. 55. N 3. С. 286–290. DOI: 10.31857/S0040357121030106. EDN: EGWNHO.

3. Яковлева М.Р., Никулина О.К., Колоскова О.В., Дымар О.В. Сравнительная оценка процессов электродиализа и электродеионизации // Пищевая промышленность: наука и технологии. 2023. Т. 16. N 4. С. 61–68. EDN: DFYPER.

4. Lazarev S.I., Khorokhorina I.V., Mikhailin M.I., Filimonova O.S. Extraction of heavy metals from washing waters of electroplating industries and calculation method of electrodeionization apparatus // Chemical and Petroleum Engineering. 2023. Vol. 59. P. 174–181. DOI: 10.1007/s10556-023-01224-2.

5. Koseoglu-Imer D.Y., Karagunduz A. Recent developments of electromembrane desalination processes // Environmental Technology Reviews. 2018. Vol. 7, no. 1. P. 199–219. DOI: 10.1080/21622515.2018.1483974.

6. Заболоцкий В.И., Утин С.В., Шельдешов Н.В., Лебедев К.А., Василенко П.А. Исследование процесса коррекции pH разбавленных растворов электролитов электродиализом с биполярными мембранами // Электрохимия. 2011. Т. 47. N 3. С. 343–348. EDN: NDPAMB.

7. Shestakov K.V., Lazarev S.I., Polyanskii K.K., Ignatov N.N. Recovery of iron, nickel, and copper in waste water from printed circuit board manufacture by electrodialysis method // Russian Journal of Applied Chemistry. 2021. Vol. 94. P. 555–559. DOI: 10.1134/S1070427221050013.

8. Zhao C., Zhang L., Ge R., Zhang A., Zhang C., Chen X. Treatment of low-level Cu(II) wastewater and regeneration through a novel capacitive deionization-electrodeionization (CDI-EDI) technology // Chemosphere. 2019. Vol. 217. P. 763–772. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.11.071.

9. Гуляева Е.С., Беренгертен М.Г. Перенос ионов через ионообменные мембраны в процессе электродиализного концентрирования // Вода: химия и экология. 2011. N 10. С. 77–81. EDN: OIMIJD.

10. Demir G., Mert A.N., Arar Ö. Utilization of electrodeionization for lithium removal // ACS Omega. 2023. Vol. 8, no. 20. P. 17583–17590. DOI: 10.1021/acsomega.2c08095.

11. Чеснокова А.Н., Жамсаранжапова Т.Д., Закарчевский С.А., Кулшреста В., Скорникова С.А., Макаров С.С. [и др.]. Влияние содержания цеолита на протонную проводимость и технические характеристики мембран на основе сшитого поливинилового спирта // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 2. С. 360–367. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-2-360-367. EDN: AMJLOB.

12. Седнева Т.А., Иваненко В.И., Беликов М.Л. Электромембранная утилизация технологических растворов с получением кондиционных кислот и щелочей // Труды Кольского научного центра РАН. 2018. Т. 9. N 2-1. С. 349–352. DOI: 10.25702/KSC.2307-5252.2018.9.1.349-352. EDN: XYENHV.

13. Краснова Т.А. Опыт использования электродиализа для переработки сточных вод органических производств // Сорбционные и хроматографические процессы. 2012. Т. 12. N 3. С. 419–427. EDN: NMNKYS.

14. Дударев В.И., Минаева Л.А. Применение углеродных сорбентов для извлечения марганца из растворов // Известия вузов. Прикладная химия и био-

технология. 2024. Т. 14. N 1. С. 35–40. DOI: 10.21285/achb.897. EDN: NNHBMP.

15. Быков В.И., Ильина С.И., Логинов В.Я., Равичев Л.В., Свитцов А.А. Электродиализ: история и перспективы развития // Вестник Технологического университета. 2021. Т. 24. N 7. С. 5–10. EDN: YWLUSF.

16. Михайлин М.И., Лазарев С.И., Хорохорина И.В., Полянский К.К. Исследование вольт-амперных характеристик процесса электродеионизации с использованием различного ионообменного наполнителя // Вестник Технологического университета. 2022. Т. 25. N 7. С. 60–63. DOI: 10.55421/1998-7072_2022_25_7_60. EDN: RHNJDI.

17. Гаврилова Т.Г., Кондратьев С.А. Развитие механизма активации сульфидной флотации ионами тяжелых металлов // Инновационные процессы комплексной переработки природного и техногенного минерального сырья (Плаксинские чтения – 2020): материалы Междунар. конф. (г. Апатиты, 21–26 сентября 2020 г.). Апатиты: Изд-во ФИЦ КНЦ РАН, 2020. С. 147–149.

18. Ren Y., Han Y., Lei X, Lu C., Liu J, Zhang G., et al. A magnetic ion exchange resin with high efficiency of removing Cr (VI) // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2020. Vol. 604. P. 125279. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2020.125279.

19. Заболоцкий В.И., Лебедев К.А., Уртенов М.Х., Никоненко В.В., Василенко П.А., Шапошник В.А. [и др.]. Математическая модель для описания вольт-амперных кривых и чисел переноса при интенсивных режимах электродиализа // Электрохимия. 2013. Т. 49. N 4. С. 416–427. DOI: 10.7868/S0424857013040142. EDN: PWNFKJ.

20. Елисеева Т.В., Харина А.Ю. Особенности вольт-амперных и транспортных характеристик анионообменных мембран при электродиализе растворов, содержащих алкилароматическую аминокислоту и минеральную соль // Электрохимия. 2015. Т. 51. N 1. С. 74–80. DOI: 10.7868/S0424857015010041. EDN: TCJCRZ.

21. Овсянникова Д.В., Бондарева Л.П., Селеменев В.Ф., Карпов С.И. Равновесная сорбция метионина на карбоксильных катионообменниках из растворов различной кислотности // Журнал физической химии. 2009. Т. 83. N 5. С. 961–966. EDN: KAVNWD.

22. Никоненко В.В., Письменская Н.Д., Володина Е.И. Зависимость скорости генерации H^+- и OH^--ионов на границе ионообменная мембрана / разбавленный раствор от плотности тока // Электрохимия. 2005. Т. 41. N 11. С. 1351–1357. EDN: HSIUHJ.

23. Ткаченко Д.О., Зажигаева К.В. Применение установок электродеионизации в практике водоподготовки на тепловых электрических станциях // Новая наука: от идеи к результату. 2016. N 4-1. С. 87–89. EDN: VVHEFL.

24. Федоренко В.И. Производство ультрачистой воды методом непрерывной электродеионизации // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37. N 3. С. 49–52. EDN: SVZNWZ.

REFERENCES

1. Li S., Dai M., Wu Y., Fu H., Hou X., Peng C., et al. Resource utilization of electroplating wastewater: obstacles and solutions. *Environmental Science: Water Research & Technology.* 2022;8:484-509. DOI: 10.1039/D1EW00712B.

2. Kruglikov S.S., Arkhipov E.A., Zhirukhin D.A., Smirnov K.N., Vagramyan T.A., Kolesnikov V.A., et al. Increasing the efficiency of electromembrane processes in the area of electrochemical cadmium plating. *Teoreticheskie osnovy khimicheskoi tekhnologii.* 2021;55(3):286-290. (In Russian). DOI: 10.31857/S0040357121030106. EDN: EGWNHO.

3. Yakovleva M.R., Nikulina O.K., Koloskova O.V., Dymar O.V. Comparative assessment of electrodialysis and electrodeionization processes. *Food Industry: Science and Technology.* 2023;16(4):61-68. (In Russian). EDN: DFYPER.

4. Lazarev S.I., Khorokhorina I.V., Mikhailin M.I., Filimonova O.S. Extraction of heavy metals from washing waters of electroplating industries and calculation method of electrodeionization apparatus. *Chemical and Petroleum Engineering.* 2023;59:174-181. DOI: 10.1007/s10556-023-01224-2.

5. Koseoglu-Imer D.Y., Karagunduz A. Recent developments of electromembrane desalination processes. *Environmental Technology Reviews.* 2018;7(1):199-219. DOI: 10.1080/21622515.2018.1483974.

6. Zabolotskii V.I., Utin S.V., Sheldeshov N.V., Lebedev K.A., Vasilenko P.A. Correction of pH of diluted solutions of electrolytes by electrodialysis with bipolar membranes. *Elektrokhimiya.* 2011;47(3):343-348. (In Russian). EDN: NDPAMB.

7. Shestakov K.V., Lazarev S.I., Polyanskii K.K., Ignatov N.N. Recovery of iron, nickel, and copper in waste water from printed circuit board manufacture by electrodialysis method. *Russian Journal of Applied Chemistry.* 2021;94:555-559. DOI: 10.1134/S1070427221050013.

8. Zhao C., Zhang L., Ge R., Zhang A., Zhang C., Chen X. Treatment of low-level Cu(II) wastewater and regeneration through a novel capacitive deionization-electrodeionization (CDI-EDI) technology. *Chemosphere.* 2019;217:763-772. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.11.071.

9. Gulyaeva E.S., Berengarten M.G. Transport of ions through ion-exchange membrane in the course of electrodialysis concentration. *Water: Chemistry and Ecology.* 2011;10:77-81. (In Russian). EDN: OIMIJD.

10. Demir G., Mert A.N., Arar Ö. Utilization of electrodeionization for lithium removal. *ACS Omega.* 2023;8(20):17583-17590. DOI: 10.1021/acsomega.2c08095.

11. Chesnokov A.N., Zhamsaranzhapova T.D., Zakarchevskiy S.A., Kulshrestha V., Skornikova S.A., Makarov S.S., et al. Effect of zeolite content on proton conductivity and technical characteristics of the membranes based on crosslinked polyvinyl alcohol. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2020;10(2):360-367. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-2-360-367. EDN: AMJLOB.

12. Sedneva T.A., Ivanenko V.I., Belikov M.L. Electromembrane recycling of technological solutions with reception of standard acids and alkalis. *Transactions of the Kola Science Centre of RAS.* 2018;9(2-1):349-352. (In Russian). DOI: 10.25702/KSC.2307-5252.2018.9.1.349-352. EDN: XYENHV.

13. Krasnova T.A. Experience of use of electrodialysis for processing of wastewater organic production. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy.* 2012;12(3):419-427. (In Russian). EDN: NMNKYS.

14. Dudarev V.I., Minaeva L.A. Use of carbon sorbents to extract manganese from solutions. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2024;14(1):35-40. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.897. EDN: NNHBMP.

15. Bykov V.I., Ilyina S.I., Loginov V.Ya., Ravichev L.V., Svitzov A.A. Electrodialysis: history and development prospects. *Herald of Technological University.* 2021;24(7):5-10. (In Russian). EDN: YWLUSF.

16. Mikhaylin M.I., Lazarev S.I., Khorokhorina I.V., Polyansky K.K. Investigation of the volt-ampere characteristics of the electrodeionization process with the use of different ion-exchange fillers. *Herald of Technological University.* 2022;25(7):60-63. (In Russian). DOI: 10.55421/1998-7072_2022_25_7_60. EDN: RHNJDI.

17. Gavrilova T.G., Kondrat'ev S.A. Development of activation mechanism of sulphide flotation by heavy metal ions. In: *Innovatsionnye protsessy kompleksnoi pererabotki prirodnogo i tekhnogennogo mineral'nogo syr'ya (Plaksinskie chteniya – 2020): materialy Mezhdunar. konf. = Innovative processes of complex treatment of natural and man-made mineral raw materials (Plaksin readings – 2020): Proc. of Int. Conf.* 21–26 September 2020, Apatity. Apatity: Federal Research Center, Kola Scientific Center of the Russian Academy of Sciences; 2020, p. 147-149. (In Russian).

18. Ren Y., Han Y., Lei X, Lu C., Liu J, Zhang G., et al. A magnetic ion exchange resin with high efficiency of removing Cr (VI). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2020;604:125279. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2020.125279.

19. Zabolotskii V.I., Lebedev K.A., Urtenov M.K., Nikonenko V.V., Vasilenko P.A., Shaposhnik V.A., et al. Mathematical model describing voltammograms and transport numbers under intensive electrodialysis modes. *Elektrokhimiya.* 2013;49(4):416-427. (In Russian). DOI: 10.7868/S0424857013040142. EDN: PWNFKJ.

20. Eliseeva T.V., Kharina A.Y. Voltammetric and transport characteristics of anion-exchange membranes during electrodialysis of solutions containing alkylaromatic amino acid and a mineral salt. *Elektrokhimiya.* 2015;51(1):74-80. (In Russian). DOI: 10.7868/S0424857015010041. EDN: TCJCRZ.

21. Ovsyannikova D.V., Bondareva L.P., Selemenev V.F., Karpov S.I. Equilibrium sorption of methionine on carboxyl cation exchangers from solutions of various acidities. *Zhurnal fizicheskoi khimii.* 2009;83(5):961-966. (In Russian). EDN: KAVNWD.

22. Nikonenko V.V., Pis'menskaya N.D., Volodina E.I. Rate of generation of ions H^+ and OH^- at the ion-exchange membrane/dilute solution interface as a function of the current density. *Elektrokhimiya.* 2005;41(11):1351-1357. (In Russian). EDN: HSIUHJ.

23. Tkachenko D.O., Zazhigaeva K.V. Application of electrodeionization units in water treatment practice at thermal power plants. *Novaya nauka: ot idei k rezul'tatu.* 2016;4-1:87-89. (In Russian). EDN: VVHEFL.

24. Fedorenko V.I. Ultrapure water production using continuous electrodeionization. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal.* 2003;37(3):49-52. (In Russian). EDN: SVZNWZ.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Лазарев Сергей Иванович,
д.т.н., профессор, заведующий кафедрой,
Тамбовский государственный
технический университет,
392000, г. Тамбов, ул. Советская, 106/5, пом. 2,
Российская Федерация,
lazarev.sergey.1962@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-0746-5161

Хорохорина Ирина Владимировна,
д.т.н., доцент,
Тамбовский государственный
технический университет,
392000, г. Тамбов, ул. Советская, 106/5, пом. 2,
Российская Федерация,
kotelnikovirina@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0001-8722-3685

Михайлин Максим Игоревич,
аспирант,
Тамбовский государственный
технический университет,
392000, г. Тамбов, ул. Советская, 106/5, пом. 2,
Российская Федерация,
ckiburs@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-7540-5924

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Sergey I. Lazarev,
Dr. Sci. (Engineering), Head of the Department,
Tambov State Technical University,
Room 2, 106/5, Sovetskaya St., Tambov, 392000,
Russian Federation,
lazarev.sergey.1962@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-0746-5161

Irina V. Khorokhorina,
Dr. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Tambov State Technical University,
Room 2, 106/5, Sovetskaya St., Tambov, 392000,
Russian Federation,
kotelnikovirina@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0001-8722-3685

Maxim I. Mikhailin,
Postgraduate Student,
Tambov State Technical University,
Room 2, 106/5, Sovetskaya St., Tambov, 392000,
Russian Federation,
ckiburs@mail.ru
https://orcid.org/0000-0001-7540-5924

Филимонова Ольга Сергеевна,
аспирант,
Тамбовский государственный
технический университет,
392000, г. Тамбов, ул. Советская, 106/5, пом. 2,
Российская Федерация,
✉ nauka2613@mail.ru
https://orcid.org/0009-0002-4164-6919

Olga S. Filimonova,
Postgraduate Student,
Tambov State Technical University,
Room 2, 106/5, Sovetskaya St., Tambov, 392000,
Russian Federation,
✉ nauka2613@mail.ru
https://orcid.org/0009-0002-4164-6919

Вклад авторов

С.И. Лазарев – научное руководство, курирование данных, написание черновика рукописи, редактирование рукописи.
И.В. Хорохорина – редактирование рукописи.
М.И. Михайлин – проведение исследования, валидация результатов.
О.С. Филимонова – написание черновика рукописи, визуализация.

Contribution of the authors

Sergey I. Lazarev – supervision, data curation, writing – original draft, editing.
Irina V. Khorokhorina – editing.
Maxim I. Mikhailin – investigation, validation.
Olga S. Filimonova – writing – original draft, visualization.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

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 11.11.2024.
Одобрена после рецензирования 19.12.2024.
Принята к публикации 31.05.2025.

Information about the article

The article was submitted 11.11.2024.
Approved after reviewing 19.12.2024.
Accepted for publication 31.05.2025.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 579.67
EDN: HQIHHZ
DOI: 10.21285/achb.979

Оптимизация условий культивирования штамма *Lactobacillus acidophilus* для получения молочной кислоты при ферментации мелассы

А.П. Непомнящий✉, И.Н. Зубков, П.Н. Сорокоумов, Н.Ю. Шарова

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

Аннотация. *Молочная кислота и ее соли (лактаты) широко применяются в пищевой промышленности в качестве регуляторов кислотности и сырья для синтеза полилактида – биоразлагаемого упаковочного материала. В наши дни бóльшую часть молочной кислоты получают биосинтетическим путем из сахаросодержащего сырья, например из свекловичной мелассы. Целью проведенного исследования являлось изучение процесса биоконверсии мелассы в молочную кислоту анаэробным штаммом Lactobacillus acidophilus AT-I. Содержание источников углерода (мелассы) и азота (дрожжевого экстракта) оптимизировалось с помощью эксперимента, поставленного по центральному композиционному плану. Анализ содержания молочной кислоты в культуральной жидкости проводился с использованием капиллярного электрофореза. Построение модели осуществлялось в среде R, а ее адекватность оценивалась с помощью F-критерия Фишера. В ходе работы выяснено, что построенная модель адекватно описывает полученные данные при уровне значимости 0,05 (дисперсия адекватности регрессионного уравнения 0,28, R^2 = 0,76, рассчитанное значение F-критерия 3,2 меньше табличного, равного 6,3). Согласно модели, наибольшая конверсия мелассы в лактат (5,6%) должна наблюдаться при концентрации мелассы 63 г/л и дрожжевого экстракта 1,9 г/л. При культивировании Lactobacillus acidophilus AT-I в биореакторе наблюдается классическая кинетика расщепления углеводов и накопления молочной кислоты. Содержание молочной кислоты спустя 96 ч культивирования достигает 5,5 г/л.*

Ключевые слова: *Lactobacillus acidophilus, лактат, свекловичная меласса, капиллярный электрофорез, периодическое культивирование*

Финансирование. *Работа выполнена в рамках государственного задания по теме FGUS-2022-0003 Всероссийского научно-исследовательского института пищевых добавок – филиала Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН (г. Санкт-Петербург, Россия).*

Для цитирования: Непомнящий А.П., Зубков И.Н., Сорокоумов П.Н., Шарова Н.Ю. Оптимизация условий культивирования штамма *Lactobacillus acidophilus* для получения молочной кислоты при ферментации мелассы // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 279–285. DOI: 10.21285/achb.979. EDN: HQIHHZ.

BRIEF COMMUNICATION

Optimization of cultivation conditions for *Lactobacillus acidophilus* to produce lactic acid through molasses fermentation

Anatolii P. Nepomniashchii✉, Ilya N. Zubkov, Pavel N. Sorokoumov, Natalya Yu. Sharova

All-Russian Research Institute for Food Additives, Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russian Federation

Abstract. *Lactic acid and its salts (lactates) are used extensively in the food industry as acidity regulators and as raw materials for the synthesis of polylactide, a biodegradable packaging material. Currently, the prevailing*

© Непомнящий А.П., Зубков И.Н., Сорокоумов П.Н., Шарова Н.Ю., 2025

method of producing lactic acid involves the biosynthetic pathway, using sugar-containing raw materials such as beet molasses. This study aims to examine the process of molasses bioconversion into lactic acid using the anaerobic strain Lactobacillus acidophilus AT-I. The concentrations of carbon (molasses) and nitrogen (yeast extract) were optimized using a central composite design experiment. The lactic acid content in the culture liquid was analyzed using capillary electrophoresis. The model was constructed in the R environment, and its adequacy was assessed using Fisher's F-test. The findings demonstrated that the model adequately described the experimental data at a significance level of 0.05 (the variance of adequacy of the regression equation of 0.28, R^2 = 0.76, the calculated value of the F-criterion (3.2) is less than the tabulated value (6.3)). According to the model, the highest conversion of molasses to lactate (5.6%) should be observed at a molasses concentration of 63 g/L and a yeast extract concentration of 1.9 g/L. The cultivation of Lactobacillus acidophilus AT-I in a bioreactor exhibited classical kinetics of carbohydrate breakdown and lactic acid accumulation, with lactic acid content reaching 5.5 g/L after 96 hours.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus, lactate, sugar beet molasses, capillary electrophoresis, batch cultivation*

Funding. *The study was carried out within the framework of the state assignment of the All-Russian Research Institute for Food Additives, Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences (project no. FGUS-2022-0003).*

For citation: Nepomniashchii A.P., Zubkov I.N., Sorokoumov P.N., Sharova N.Yu. Optimization of cultivation conditions for *Lactobacillus acidophilus* to produce lactic acid through molasses fermentation. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2):279-285. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.979. EDN: HQIHHZ.

ВВЕДЕНИЕ

Молочная кислота и ее производные широко используются в пищевой промышленности. Помимо применения в качестве регулятора кислотности, молочная кислота служит прекурсором в получении полилактида – ценного биоразлагаемого пластика, который является перспективной заменой многих синтетических материалов [1, 2]. Существует два основных метода синтеза молочной кислоты и ее солей (лактатов): химический [3] и биотехнологический с использованием анаэробных лактобацилл [4–6]. По сравнению с химическими методами синтеза [7] получение лактата путем анаэробной ферментации содержащих углеводы сред обладает рядом преимуществ. В частности, биотехнологический путь синтеза обладает высокой энантиоселективностью [8], не требует использования повышенных температур и токсичных реагентов [7].

На сегодняшний день известен большой круг гомоферментативных лактобактерий, которые расщепляют простые углеводы до молочной кислоты [9–11]. Так как что простые углеводы обладают высокой стоимостью [12], неоднократно предпринимались попытки использовать для синтеза лактата полисахариды, например крахмал [11] или целлюлозу [13]. Тем не менее применение полисахаридов в других важных областях промышленности вынуждает использовать для синтеза молочной кислоты вторичные продукты переработки сахаров и крахмала, в первую очередь свекловичную мелассу [14]. В обычной мелассе содержание углеводов достигает 40% и более[1] [15]. Однако новые технологии переработки свекловичной мелассы предполагают удаление из нее большей части углеводов, которые способны усваивать лактобациллы. Содержание углеводов в мелассе, полученной с помощью современных технологических процессов, может быть снижено до 10%[2]. Кроме того, содержание сухих веществ и кислотность обедненной мелассы часто не соответствуют государственным стандартам[1]. Возможности применения такой мелассы в биотехнологических процессах изучаются многими научными группами.

Целью представленной работы являлась оптимизация условий биосинтетического получения молочной кислоты с помощью сред, содержащих обедненную свекловичную мелассу, и продуцента *Lactobacillus acidophilus* AT-I.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

– проведение серии экспериментов по центральному композиционному плану с варьированием концентраций мелассы *M* и дрожжевого экстракта *YE*;

– построение зависимости конверсии субстрата в лактат *q* от содержания нутриентов (*M* и *YE*) в среде для культивирования;

– изучение кинетики накопления молочной кислоты в оптимизированных условиях при ферментации мелассы *L. acidophilus* AT-I в биореакторе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовалась культура *L. acidophilus* AT-I из коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института пищевых добавок – филиала Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН (г. Санкт-Петербург, Россия). Ранее было показано, что бактерии *L. acidophilus* способны сбраживать дисахариды в лактат с высокой степенью конверсии [16].

Среды для культивирования содержали 0,1 г/л $MgSO_4$, 1 г/л K_2HPO_4 и 0,05 г/л $MnSO_4$. В качестве субстрата следует использовать обедненную свекловичную мелассу с массовой долей дисахаридов не менее 30% (в работе применялась меласса с содержанием дисахаридов 35%, не содержащая моносахаридов). Доля сухих веществ и pH, измеренные в соответствии с ГОСТ 30561-2017[2], составляли 68% и 7,0 соответственно. Содержание мелассы *M* и дрожжевого экстракта *YE* в среде для основного культивирования варьировалось согласно

[1] ГОСТ 30561-2017. Меласса свекловичная. Технические условия. М.: Стандартинформ, 2017. 22 с.

[2] Molasses-desugaring process // Beet-sugar handbook / ed. M. Asadi. John Wiley & Sons, 2005. P. 517–546.

центральному композиционному ротатабельному плану эксперимента. Среды для получения инокулята содержали 20 г/л мелассы, 10 г/л дрожжевого экстракта и 1 г/л K_2HPO_4. pH сред для культивирования доводился до 7,0 перед культивированием с помощью 1N NaOH. В экспериментах по оптимизации состава среды и для получения инокулята культивирование проводилось в колбах Эрленмейера объемом 750 мл (объем среды 100 мл). Объем добавляемого в среду для основного культивирования инокулята составлял 10 мл. Культивирование проводилось в термостате при 37 °C в течение 48 ч.

Определение концентрации молочной кислоты осуществлялось на установке для капиллярного электрофореза Капель-205 («Люмэкс», Россия) в соответствии с рекомендуемой производителем методикой. Образцы бесклеточной культуральной жидкости, разбавленной дистиллированной водой в 100 раз (100 мкл), смешивали с метанолом (300 мкл) и центрифугировали при 6300 g для удаления белков и пептидов. Разделение проводили в капилляре с внутренним диаметром 75 мкм и длиной 60 см при отрицательной полярности подаваемого напряжения. Детекция осуществлялась с помощью фотометрического детектора при длине волны 254 нм. Для количественного определения лактата использовалась калибровочная зависимость.

Содержание моно- и дисахаридов в свекловичной мелассе и культуральных средах контролировалось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с рефрактометрической детекцией. Использовался хроматограф Agilent 1260 Infinity II, снабженный колонкой Hi-Plex Ca 300×7,7 мм (Agilent Technologies, США). Перед разделением образцы мелассы и бесклеточной культуральной жидкости (200 мкл) смешивали с метанолом (400 мкл) для осаждения белков и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Образцы центрифугировали 5 мин при 15000 g, супернатант (400 мкл) отделяли и смешивали с деионизованной водой (800 мкл). 20 мкл полученного раствора вводили в колонку и проводили элюирование в изократическом режиме (элюент – деионизованная вода, скорость потока 0,6 мл/мл, температура колонки 80 °C). Количественное определение осуществлялось с помощью градуировочной прямой.

Зависимость конверсии мелассы в лактат от содержания источников углерода и азота строили в среде R[3]. Оценку адекватности полученной зависимости проводили с помощью *F*-критерия Фишера. Оптимальные условия культивирования *L. acidophilus* AT-I определяли путем дифференцирования полученной зависимости по имеющимся переменным.

Культивирование *L. acidophilus* AT-I в биореакторе (Sartorius Biostat A, Sartorius, Германия) осуществляли в оптимизированных условиях. Объем среды для культивирования составлял 500 мл, объем инокулята – 50 мл. Образцы для оценки содержания лактата и остаточных углеводов отбирали спустя 12, 24, 48, 72 и 96 ч после начала основного культивирования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе использовался образец обедненной свекловичной мелассы, физико-химические характеристики которого отличались от принятого государственного стандарта[1]. Суммарное содержание дисахаридов – сахарозы и мальтозы – в обедненной мелассе (35%) даже ниже, чем требуемое ГОСТ 30561-2017 содержание сахарозы (43%). Доля сухих веществ (68%) также отличается от требуемой государственным стандартом (75%). Содержание моносахаридов (менее 1%) и pH (7,0) находилось в пределах, установленных государственным стандартом. Таким образом, для биосинтетического получения лактата с помощью *L. acidophilus* AT-I может использоваться меласса, обладающая худшими физико-химическими характеристиками, чем предполагает ГОСТ 30561-2017.

Полученные экспериментальные данные о зависимости выхода молочной кислоты (*LA*) и конверсии мелассы в лактат (*q*) от содержания в среде питательных веществ (мелассы *M* и дрожжевого экстракта *YE*) показаны в таблице. Функция зависимости конверсии *q* от концентраций питательных веществ (1) оптимизирована с использованием среды R. Графически данная функция представлена на рис. 1.

$$q = 0{,}063 \times M + 3{,}73 \times YE - 0{,}0005 \times M^2 - 0{,}97 \times YE^2, \quad (1)$$

где *q* – конверсия мелассы в лактат, %; *M* – концентрация мелассы в среде для культивирования, г/л; *YE* – концентрация дрожжевого экстракта в среде для культивирования, г/л.

План эксперимента по оптимизации условий биосинтетического получения молочной кислоты с помощью *Lactobacillus acidophilus* AT-I

Plan of the optimization experiment for lactic acid biosynthetic production by *Lactobacillus acidophilus* AT-I

M, г/л	*YE*, г/л	*LA*, г/л	*q*, %
60 (-1)	1,00 (-1)	3,2	5,4
120 (+1)	1,00 (-1)	3,8	3,2
60 (-1)	3,00 (+1)	2,4	4,0
120 (+1)	3,00 (+1)	3,8	3,2
47,6 (-√2)	2,00 (0)	2,7	5,6
132,4 (+√2)	2,00 (0)	4,0	3,0
90 (0)	0,59 (-√2)	2,8	3,1
90 (0)	3,41 (+√2)	2,9	3,3
		4,3	4,8
		4,7	5,2
90 (0)	2,00 (0)	4,1	4,6
		4,3	4,8
		4,7	5,2

Примечание. В скобках приведены кодированные уровни факторов. *M* – меласса, *YE* – дрожжевой экстракт, *LA* – концентрация молочной кислоты в конце культивирования, *q* – конверсия мелассы в лактат.

Для расчета значения *F*-критерия Фишера использовались дисперсии адекватности (0,28) и воспроизводимости (0,083). Табличное значение *F*-критерия (6,3 при

[3] R: a language and environment for statistical computing // R-project.org. Режим доступа: https://www.r-project.org/ (дата обращения: 27.02.2024).

Рис. 1. Зависимость конверсии мелассы в лактат от концентраций мелассы и дрожжевого экстракта

Fig. 1. Dependence of molasses conversion to lactate on the concentrations of molasses and yeast extract

уровне значимости 0,05, числе степеней свободы 5 и 4) выше, чем рассчитанное (3,2). Таким образом, зависимость (1) адекватно описывает данные, полученные из эксперимента. Рассчитанное значение множественного коэффициента корреляции R^2 равно 0,76. Согласно расчетам, наибольшая конверсия мелассы в лактат (5,6±1,8%) обеспечивается при содержании в среде для культивирования мелассы 63 г/л и дрожжевого экстракта 1,9 г/л. Для вычисления доверительного интервала (1,8%) использовался критерий Стьюдента и уровень значимости 0,05.

Данные о потреблении дисахаридов и продукции молочной кислоты *L. acidophilus* AT-I в биореакторе в оптимизированных условиях представлены на рис. 2. Усвоение дисахаридов *L. acidophilus* AT-I происходит в течение первых суток культивирования. Известно, что бактерии *Lactobacillus* продуцируют внутриклеточные инвертазы[3] [17–20], которые быстро расщепляют дисахариды до простых углеводов. Конверсия углеводов в молочную кислоту после 48 ч культивирования (6,8%) соответствует расчетной (5,6±1,8%). Однако синтез лактата продолжается значительно дольше и его концентрация становится постоянной лишь после 72 ч культивирования. К моменту окончания ферментации (96 ч) содержание молочной кислоты в культуральной жидкости составляло 5,5 г/л, а конверсия мелассы в лактат – 8,7%. Если учесть, что содержание дисахаридов в мелассе не превышало 35%, можно рассчитать конверсию дисахаридов – она составляет около 25%.

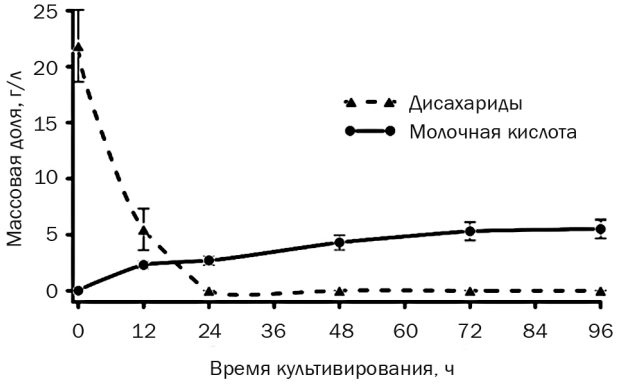


Рис. 2. Зависимость массовых концентраций дисахаридов и молочной кислоты от времени культивирования *Lactobacillus acidophilus* AT-I в условиях биореактора

Fig. 2. Dependence of mass concentrations of disaccharides and lactic acid on the cultivation time of *Lactobacillus acidophilus* AT-I under bioreactor conditions

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в представленной работе показана статистическая значимость зависимости степени конверсии обедненной свекловичной мелассы в молочную кислоту от концентраций субстрата и источника азота при культивировании *L. acidophilus* AT-I. С помощью построенной модели определены оптимальные значения концентраций мелассы *M* и дрожжевого экстракта *YE*. Установлено, что при ферментации обедненной мелассы *L. acidophilus* AT-I в анаэробных условиях в биореакторе образуется 5,5 г/л молочной кислоты (степень конверсии мелассы в лактат 8,7%, а углеводов мелассы в лактат – 25%).

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ayivi R.D., Gyawali R., Krastanov A., Aljaloud S.O., Worku M., Tahergorabi R., et al. Lactic acid bacteria: food safety and human health applications // Dairy. 2020. Vol. 1, no. 3. P. 202–232. DOI: 10.3390/dairy1030015.

2. Rajeshkumar G., Seshadri S.A., Devnani G.L., Sanjay M.R., Siengchin S., Maran J.P., et al. Environment friendly, renewable and sustainable poly lactic acid (PLA) based natural fiber reinforced composites – a comprehensive review // Journal of Cleaner Production. 2021. Vol. 310. P. 127483. DOI: 10.1016/j.jclepro.2021.127483.

3. Juodeikiene G., Vidmantiene D., Basinskiene L., Cernauskas D., Bartkiene E., Cizeikiene D. Green metrics for sustainability of biobased lactic acid from starchy biomass vs chemical synthesis // Catalysis Today. 2015. Vol. 239. P. 11–16. DOI: 10.1016/j.cattod.2014.05.039.

4. Korcz E., Varga L. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: techno-functional application in the food industry // Trends in Food Science & Technology. 2021. Vol. 110. P. 375–384. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.02.014.

5. Macedo J.V.C., de Barros Ranke F.F., Escaramboni B., Campioni T.S., Fernández Núñez E.G., de Oliva Neto P. Cost-effective lactic acid production by fermentation of agro-industrial residues // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020. Vol. 27. P. 101706. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101706.

6. Tian X., Chen H., Liu H., Chen J. Recent advances in lactic acid production by lactic acid bacteria // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2021. Vol. 193. P. 4151–4171. DOI: 10.1007/s12010-021-03672-z.

7. Bhattacharyya S.K., Palit S.K., Das A.R. Catalytic synthesis of lactic acid from acetaldehyde, carbon monoxide, and water // Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development. 1970. Vol. 9, no. 1. P. 92–95. DOI: 10.1021/i360033a018.

8. 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.

9. Полянский К.К., Шуваева Г.П., Деменко Н.Д., Яковлев В.Ф. Производство молочной кислоты // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 1997. N 1. С. 8–14. EDN: QAKEYZ.

10. Василинец И.М., Гаджиев Э.А., Евелева В.В., Филимонова И.Н., Черпалова Т.М. Использование крахмалосодержащего сырья в производстве пищевой молочной кислоты // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 1998. N 4. С. 60–62. EDN: QCPDRV.

11. Aso Y., Hashimoto A., Ohara H. Engineering *Lactococcus lactis* for D-lactic acid production from starch // Current Microbiology. 2019. Vol. 76, no. 10. P. 1186–1192. DOI: 10.1007/s00284-019-01742-4.

12. Abdel-Rahman M.A., Hassan S.E.-D., Alrefaey H.M.A., El-Belely E.F., Elsakhawy T., Fouda A., et al. Subsequent improvement of lactic acid production from beet molasses by *Enterococcus hirae* ds10 using different fermentation strategies // Bioresource Technology Reports. 2021. Vol. 13. P. 100617. DOI: 10.1016/j.biteb.2020.100617.

13. Wang Y., Deng W., Wang B., Zhang Q., Wan X., Tang Z., et al. Chemical synthesis of lactic acid from cellulose catalysed by lead (II) ions in water // Nature Communications. 2013. Vol. 4. P. 2141. DOI: 10.1038/ncomms3141.

14. Ahmad A., Banat F., Taher H. A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges // Environmental Technology & Innovation. 2020. Vol. 20. P. 101138. DOI: 10.1016/j.eti.2020.101138.

15. Palmonari A., Cavallini D., Sniffen C.J., Fernandes L., Holder P., Fagioli L., et al. Characterization of molasses chemical composition // Journal of Dairy Science. 2020. Vol. 103, no. 7. P. 6244–6249. DOI: 10.3168/jds.2019-17644.

16. Shipovskaya E.A., Eveleva V.V., Cherpalova T.M. Biosynthetic activity study of *Lactobacillus acidophilus* lactic acid bacteria in the lactose fermentation of whey // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N 4. С. 635–642. DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-4-635-642. EDN: QJPYTD.

17. Manoochehri H., Fayazi N., Saidijam M., Taheri M., Rezaee H., Nouri F. A review on invertase: its potentials and applications // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020. Vol. 25. P. 101599. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101599.

18. De Ginés S.C., Maldonado M.C., de Valdez G.F. Purification and characterization of invertase from *Lactobacillus reuteri* CRL 1100 // Current Microbiology. 2000. Vol. 40, no. 3. P. 181–184. DOI: 10.1007/s002849910036.

19. Awad G.E., Amer H., El-Gammal E.W., Helmy W.A., Esawy M.A., Elnashar M.M. Production optimization of invertase by *Lactobacillus brevis* Mm-6 and its immobilization on alginate beads // *Carbohydrate Polymers*. 2013 Vol. 93, no 2. P. 740–746. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.12.039.

20. Liu J., Cheng J., Huang M., Shen C., Xu K., Xiao Y., et al. Identification of an invertase with high specific activity for raffinose hydrolysis and its application in soymilk treatment // *Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol. 12. P. 646801. DOI: 10.3389/fmicb.2021.646801.

REFERENCES

1. Ayivi R.D., Gyawali R., Krastanov A., Aljaloud S.O., Worku M., Tahergorabi R., et al. Lactic acid bacteria: food safety and human health applications. *Dairy*. 2020;1(3):202-232. DOI: 10.3390/dairy1030015.

2. Rajeshkumar G., Seshadri S.A., Devnani G.L., Sanjay M.R., Siengchin S., Maran J.P., et al. Environment friendly, renewable and sustainable poly lactic acid (PLA) based natural fiber reinforced composites – a comprehensive review. *Journal of Cleaner Production*. 2021;310:127483. DOI: 10.1016/j.jclepro.2021.127483.

3. Juodeikiene G., Vidmantiene D., Basinskiene L., Cernauskas D., Bartkiene E., Cizeikiene D. Green metrics for sustainability of biobased lactic acid from starchy biomass vs chemical synthesis. *Catalysis Today*. 2015;239:11-16. DOI: 10.1016/j.cattod.2014.05.039.

4. Korcz E., Varga L. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 2021;110:375-384. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.02.014.

5. Macedo J.V.C., de Barros Ranke F.F., Escaramboni B., Campioni T.S., Fernández Núñez E.G., de Oliva Neto P. Cost-effective lactic acid production by fermentation of agro-industrial residues. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;27:101706. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101706.

6. Tian X., Chen H., Liu H., Chen J. Recent advances in lactic acid production by lactic acid bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2021;193:4151-4171. DOI: 10.1007/s12010-021-03672-z.

7. Bhattacharyya S.K., Palit S.K., Das A.R. Catalytic synthesis of lactic acid from acetaldehyde, carbon monoxide, and water. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*. 1970;9(1):92-95. DOI: 10.1021/i360033a018.

8. 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.

9. Polyanskii K.K., Shuvaeva G.P., Demenko N.D., Yakovlev V.F. Lactic acid production. *Izvestiya vyzov. Food Technology*. 1997;1:8-14. (In Russian). EDN: QAKEYZ.

10. Vasilinets I.M., Gadzhiev EH.A., Eveleva V.V., Filimonova I.N., Cherpalova T.M. Use of starch-containing raw materials in the production of food lactic acid. *Izvestiya vyzov. Food Technology*. 1998;4:60-62. (In Russian). EDN: QAKEYZ.

11. Aso Y., Hashimoto A., Ohara H. Engineering *Lactococcus lactis* for D-lactic acid production from starch. *Current Microbiology*. 2019;76(10):1186-1192. DOI: 10.1007/s00284-019-01742-4.

12. Abdel-Rahman M.A., Hassan S.E.-D., Alrefaey H.M.A., El-Belely E.F., Elsakhawy T., Fouda A., et al. Subsequent improvement of lactic acid production from beet molasses by *Enterococcus hirae* ds10 using different fermentation strategies. *Bioresource Technology Reports*. 2021;13:100617. DOI: 10.1016/j.biteb.2020.100617.

13. Wang Y., Deng W., Wang B., Zhang Q., Wan X., Tang Z., et al. Chemical synthesis of lactic acid from cellulose catalysed by lead (II) ions in water. *Nature Communications*. 2013. Vol. 4. P. 2141. DOI: 10.1038/ncomms3141.

14. Ahmad A., Banat F., Taher H. A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges. *Environmental*

Technology & Innovation. 2020;20:101138. DOI: 10.1016/j.eti.2020.101138.

15. Palmonari A., Cavallini D., Sniffen C.J., Fernandes L., Holder P., Fagioli L., et al. Characterization of molasses chemical composition. *Journal of Dairy Science*. 2020;103(7):6244-6249. DOI: 10.3168/jds.2019-17644.

16. Shipovskaya E.A., Eveleva V.V., Cherpalova T.M. Biosynthetic activity study of *Lactobacillus acidophilus* lactic acid bacteria in the lactose fermentation of whey. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(4):635-642. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2019-9-4-635-642. EDN: QJPYTD.

17. Manoochehri H., Fayazi N., Saidijam M., Taheri M., Rezaee H., Nouri F. A review on invertase: its potentials and applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;25:101599. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101599.

18. De Ginés S.C., Maldonado M.C., de Valdez G.F. Purification and characterization of invertase from *Lactobacillus reuteri* CRL 1100. *Current Microbiology*. 2000;40(3):181-184. DOI: 10.1007/s002849910036.

19. Awad G.E., Amer H., El-Gammal E.W., Helmy W.A., Esawy M.A., Elnashar M.M. Production optimization of invertase by *Lactobacillus brevis* Mm-6 and its immobilization on alginate beads. *Carbohydrate Polymers*. 2013;93(2):740-746. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.12.039.

20. Liu J., Cheng J., Huang M., Shen C., Xu K., Xiao Y., et al. Identification of an invertase with high specific activity for raffinose hydrolysis and its application in soymilk treatment. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:646801. DOI: 10.3389/fmicb.2021.646801.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Непомнящий Анатолий Павлович,
аспирант, младший научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН,
191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55,
Российская Федерация,
✉ Nepomnyashiy.95@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-0088-2704

Зубков Илья Николаевич,
лаборант-исследователь,
Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН,
191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55,
Российская Федерация,
zub-i@bk.ru
https://orcid.org/0000-0002-6533-8139

Сорокоумов Павел Николаевич,
аспирант, научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН,
191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55,
Российская Федерация,
sorokoumov_pavel@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-8767-3720

Шарова Наталья Юрьевна,
д.т.н., профессор РАН,
заместитель директора по научной работе,
Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН,
191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55,
Российская Федерация,
natalya_sharova1@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-4208-9299

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anatolii P. Nepomniashchii,
Postgraduate Student, Junior Researcher,
All-Russian Research Institute for Food Additives,
Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences,
55, Liteyny Ave., Saint Petersburg, 191014,
Russian Federation,
✉ Nepomnyashiy.95@mail.ru
https://orcid.org/0000-0003-0088-2704

Ilya N. Zubkov,
Laboratory Assistant,
All-Russian Research Institute for Food Additives,
Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences,
55, Liteyny Ave., Saint Petersburg, 191014,
Russian Federation,
zub-i@bk.ru
https://orcid.org/0000-0002-6533-8139

Pavel N. Sorokoumov,
Postgraduate Student, Researcher,
All-Russian Research Institute for Food Additives,
Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences,
55, Liteyny Ave., Saint Petersburg, 191014,
Russian Federation,
sorokoumov_pavel@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-8767-3720

Natalya Yu. Sharova,
Dr. Sci. (Engineering), Professor of the Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Research,
All-Russian Research Institute for Food Additives,
Branch of V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences,
55, Liteyny Ave., Saint Petersburg, 191014,
Russian Federation,
natalya_sharova1@mail.ru
https://orcid.org/0000-0002-4208-9299

Вклад авторов

А.П. Непомнящий – проведение исследования, написание черновика рукописи.
И.Н. Зубков – формальный анализ, редактирование рукописи.
П.Н. Сорокоумов – проведение исследования.
Н.Ю. Шарова – разработка концепции, научное руководство.

Contribution of the authors

Anatolii P. Nepomniashchii – investigation, writing – original draft.
Ilya N. Zubkov – formal analysis, editing.
Pavel N. Sorokoumov – investigation.
Natalya Yu. Sharova – conceptualization, supervision.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

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 03.04.2024.
Одобрена после рецензирования 15.06.2024.
Принята к публикации 31.05.2025.

Information about the article

The article was submitted 03.04.2024.
Approved after reviewing 15.06.2024.
Accepted for publication 31.05.2025.

Уважаемые читатели!

Приглашаем Вас к активному творческому сотрудничеству по научным направлениям:

- Химические науки
- Физико-химическая биология
- Химическая технология

Журнал «Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология» включен в перечень рецензируемых научных изданий (Перечень ВАК) и следующие базы данных: Russian Science Citation Index (RSCI), Web of Science (ESCI), Chemical Abstracts Service (CAS), EBSCO Publishing Databases, European Reference Index for the Humanities and the Social Sciences (ERIH PLUS), ВИНИТИ РАН, система Российского индекса научного цитирования, представлен в электронной библиотеке Cyberleninka, Directory of Open Access Journals (DOAJ) и описан в Ulrich's Periodicals Directory.

Публикациям журнала присваивается DOI (Digital object identifier).

Редколлегия

Dear readers!

We would like to invite you to creative cooperation in the fields:

- Chemical Sciences
- Physical-Chemical and General Biology
- Chemical Technology

The Journal "Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya" is included in the list of journals which are regarded as academic publications by the State Commission for Academic Degrees and Titles (VAK). The Journal also is indexing in Russian Science Citation Index (RSCI), Web of Science (ESCI), Chemical Abstracts Service (CAS), EBSCO Publishing Databases, European Reference Index for the Humanities and the Social Sciences (ERIH PLUS), VINITI Database (Referativnyi Zhurnal), Russian Science Citation Index, included in the digital scientific library Cyberleninka, Directory of Open Access Journals (DOAJ) and is described in Ulrich's Periodicals Directory.

Publications are assigned a DOI (Digital object identifier).

Editorial Board

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
ПРИКЛАДНАЯ ХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Том 15 N 2 (53) 2025

12+

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
APPLIED CHENISTRY AND BIOTECHNOLOGY

Volume 15 N 2 (53) 2025

Редактор Ф.А. Посысоева

Перевод на английский язык:
А.В. Квеглис, Anastasia Stosic (PhD), Dusan Stosic (PhD),
Thomas Beavitt, Е.А. Привалова
Верстка Т.С. Жевлаковой

Дата выхода в свет 27.06.2025. Формат 60 x 90 / 8.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 18,5
Тираж 500 экз. Зак. 57. Поз. плана 5н.

Отпечатано в типографии издательства
ФГБОУ ВО «ИРНИТУ»
Адрес типографии:
Россия, 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83А

Издание распространяется бесплатно
ФГБОУ ВО «ИРНИТУ»,
Россия, 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83