

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

12+

Том 11 N 2

2021



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ

**Прикладная химия
и биотехнология**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ

ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия
и биотехнология

Том 11 N 2 2021



ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского
технического университета



ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия и биотехнология
Том 11 N 2 2021

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор:

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

Заместитель главного редактора:

Пожидаев Ю.В. д.х.н., профессор кафедры химии и пищевой технологии Иркутского национального исследовательского технического университета (г. Иркутск, Россия)

Члены редакционной коллегии:

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

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

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

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

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

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

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

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

Метнер Франк-Юрген доктор наук, профессор, заведующий кафедрой пивоварения Берлинского технического университета (г. Берлин, Германия)

Непомнящих А.И. д.ф.-м.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, заместитель директора Института геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН (г. Иркутск, Россия)

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

Рогожин В.В. д.б.н., профессор, заведующий лабораторией исследования биологически активных веществ Якутской государственной сельскохозяйственной академии (г. Якутск, Россия)

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

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

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

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

Цыренов В.Ж. д.б.н., профессор, Заслуженный деятель науки и техники РФ, заведующий кафедрой биотехнологии Восточно-Сибирского государственного университета технологии и управления (г. Улан-Удэ, Россия)

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

Шен Янминг профессор, заместитель декана факультета химической инженерии, Шеньянский институт химической технологии, (г. Шеньян, Китай)

Ответственный секретарь:

Чеснокова А.Н. к.х.н., Иркутский национальный исследовательский технический университет (г. Иркутск, Россия)

Журнал основан в 2011 г.

Периодичность издания – 4 раза в год.

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

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

Учредитель Иркутский национальный исследовательский технический университет

Подписной индекс в Каталоге российской прессы «Почта России» – 24682

Адрес учредителя и издателя:

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

Адрес редакции:

664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83, ауд. Д-215

E-mail: biochem@istu.edu

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
IZVESTIYA VUZOV.
Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya
Volume 11 N 2 2021
EDITORIAL BOARD

Editor in Chief :

Sergei N. Evstafev

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

Deputy Editor:

Yuriy N. Pozhidaev

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

Editorial council:

Gennadiy B. Borovskii

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

Svetlana Yu. Bratskaya

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

Sergey D. Varfolomeyev

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Correspondent member of RAS, Director of N.M. Emmanuel Institute of Biochemical Physics (Moscow, Russia)

Francis Verpoort

Dr., Professor, Department of Environmental Technology, Food Technology and Molecular Biotechnology, Ghent University Global Campus, (Incheon, Korea)

Vladimir K. Voronov

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Irkutsk National Research Technical University, Professor of Mathematics Department (Irkutsk, Russia)

Enjun Gao

Professor, Head of the Laboratory of Coordination Chemistry, Shenyang Institute of Chemical Technology (Shenyang, China)

Mirali N. Dadashev

Dr. Sci. (Engineering), Professor, Gubkin Russian State University of Oil and Gas, Senior research associate of Physical and Colloid Chemistry Department (Moscow, Russia)

Mikhail Ya. Ielovich

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Head of Chemical Department, Biotechnology Company "Celdesigner" (Rehovot, Israel)

Frank-Juergen Methner

Dr., Professor, Berlin Institute of Technology, Head of Brewing Science Department (Berlin, Germany)

Alexander I.

Nepomnyashchikh

Dr. Sci. (Phys.-Math.), Professor, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Deputy Director of Vinogradov Institute of Geochemistry SB RAS (Irkutsk, Russia)

Purevsuren Barnasan

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

Vasily V. Rogozhin

Dr. Sci.(Biology), Professor, Yakutsk State Agricultural Academy, Head of the Laboratory for bioactive substance studies (Yakutsk, Russia)

Valentina P. Salovarova

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

Sanjib Kumar Panda

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

Boris A. Ulyanov

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

Vitaliy V. Khutoryanskiy

Ph.D. (Chemistry), Professor of Pharmaceutical School of University of Reading (London, Great Britain)

Vladimir Zh. Tsyrenov

Dr. Sci.(Biology), Professor, Honored Worker of Science and Engineering of the Russian Federation, East Siberia State University of Technology and Management, Head of Biotechnology Department (Ulan-Ude, Russia)

Vera A. Chkhenkeli

Dr. Sci.(Biology), Professor, Irkutsk State Agricultural University, Head of Anatomy, Physiology and Microbiology Department (Irkutsk, Russia)

Yanming Shen

Professor, Vice-Dean of Department of Chemical Engineering, Shenyang Institute of Chemical Technology (Shenyang, China)

Executive Secretary:

Alexandra N. Chesnokova

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

The journal was founded in 2011. The journal is issued 4 times a year.

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

Certificate of registration FS 77-62814 of 18 August, 2015

The journal is included in Ulrich's Periodicals Directory Founder and Publisher:

the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education

Irkutsk National Research Technical University

The subscription index in the Catalogue of the Russian Press "Pochta Rossii" is – 24682.

Address of the founder and publisher:

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

Editorial address:

D-215, 83, Lermontov St., Irkutsk, 664074, Russian Federation,

E-mail: biochem@istu.edu

СОДЕРЖАНИЕ

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

| | |
|---|-----|
| Барышок В.П., Зельбст Э.А. Неподелённая электронная пара сурьмы как стереоэлектронный барьер на пути к стибатрану..... | 178 |
| Обидов З.Р., Иброхимов П.Р., Рахимов Ф.А., Ганиев И.Н. Анодное поведение сплава Zn _{0.5} Al, легированного молибденом, в кислых, нейтральных и щелочных средах.... | 187 |
| Евстафьев С.Н., Фомина Е.С., Тигунцева Н.П., Шашкина С.С. Радикальные превращения органических растворителей в суб- и сверхкритических условиях..... | 195 |

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

| | |
|---|-----|
| Пивненко Т.Н., Карпенко Ю.В., Позднякова Ю.М., Кращенко В.В., Есипенко Р.В. Обоснование условий применения трансклутаминазы в технологии формованной продукции из обводненного рыбного сырья..... | 205 |
| Степаненко Л.А., Джиоев Ю.П., Злобин В.И., Борисенко А.Ю., Саловарова В.П., Арефьева Н.А., Семинский И.Ж., Малов И.В. Разработка подходов скрининга высокоспецифичных бактериофагов на основе биоинформационного анализа структур CRISPR-Cas систем <i>Corynebacterium diphtheria</i> | 216 |
| Кирдей Т.А. Влияние гумусовых кислот низинного торфа на ремедиационные свойства растений пшеницы при комплексном загрязнении тяжелыми металлами..... | 228 |
| Фомичева Н.В., Рабинович Г.Ю., Прутенская Е.А., Смирнова Ю.Д. Микробиологическая оценка процесса ускоренной твердофазной ферментации органического сырья..... | 236 |
| Матвеев Ю.И., Аверьянова Е.В. Анализ степени ветвления амилопектина и содержания амилозы в картофельных крахмалах по данным микрокалориметрии..... | 244 |
| Бельков В.И., Белогуб К.Е., Гарник Е.Ю., Тарасенко В.И., Константинов Ю.М. Исследование роли фоторецепторов у <i>Arabidopsis thaliana</i> в регуляции процесса <i>state transitions</i> | 251 |
| Дышлюк Л.С., Дроздова М.Ю., Лосева А.И. Исследование показателей безопасности экстрактов каллусных культур <i>Pulmonaria officinalis</i> и их фитохимического состава на наличие биологически активных веществ с потенциальными геропротекторными свойствами..... | 260 |
| Филипенко Г.И., Адамович С.Н., Оборина Е.Н., Розенцвейг И.Б., Сафина Г.Ф. Влияние протатранов на всхожесть семян пшеницы и тритикале после их длительного хранения..... | 272 |
| Ашуров А.И., Джонмуродов А.С., Усманова С.Р., Холов Ш.Е., Мухидинов З.К. Характеристика полисахаридов из корней <i>Eremurus hissaricus</i> методом ИК-Фурье спектроскопии..... | 281 |
| Стурова Ю.Г., Гришкова А.В., Коньшин В.В. Влияние пробиотических культур и липолитических ферментов на свойства молочного продукта в разрабатываемой биотехнологии сыра..... | 290 |
| Ковехова А.В., Арефьева О.Д., Диденко Н.А., Земнухова Л.А. Состав неорганических компонентов стеблей топинамбура..... | 299 |
| Черепанов И.С., Камашева А.А., Кашапова Э.И. Синтез и биологическая активность N ⁶ -маннопиранозиладенинов..... | 310 |

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

| | |
|--|-----|
| Чугунов А.Д., Филатова Е.Г. Адсорбция нефтепродуктов модифицированными и активированными адсорбентами..... | 318 |
|--|-----|

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

| | |
|---|-----|
| Ушаков И.А., Никонова В.С., Польшинский И.В., Князева Л.Г., Польшинская М.М. Анциферов Е.А. Исследование эффективности ингибиторов коррозии на основе производных изотиуруниевых солей..... | 326 |
|---|-----|

CONTENTS

CHEMICAL SCIENCES

| | |
|---|-----|
| Baryshok V.P., Zel'bst E.A. Antimony lone electronic pair as a stereoelectronic barrier to stibatrane..... | 178 |
| Obidov Z.R., Ibrohimov P.R., Rahimov F.A., Ganiev I.N. Anodic behaviour of Zn _{0.5} Al doped with molybdenum in acidic, neutral and alkaline media..... | 187 |
| Evstaf'ev S.N., Fomina E.S., Tiguntceva N.P., Shashkina S.S. Radical transformations of organic solvents under sub- and supercritical conditions..... | 195 |

PHYSICAL-CHEMICAL BIOLOGY

| | |
|---|-----|
| Pivnenko T.N., Karpenko Yu.V., Pozdnyakov Yu.M., Kraschenko V.V., Esipenko R.V. Application of transglutaminase in moulded food processing from waterlogged fish raw materials..... | 205 |
| Stepanenko L.A., Dzhioev Yu.P., Zlobin V.I., Borisenko A.Yu., Salovarova V.P., Arefieva N.A., Seminsky I.Zh., Malov I.V. Development of screening approaches of highly specific bacteriophages based on bioinformatic analysis of CRISPR-Cas structures of <i>Corynebacterium diphtheriae</i> systems..... | 216 |
| Kirdey T.A. Influence of humic acids in lowland peat on the remediation properties of wheat plants against heavy metal contamination..... | 228 |
| Fomicheva N.V., Rabinovich G.Yu., Prutenskaya E.A., Smirnova Yu.D. Microbiologic assessment of accelerated solid-state fermentation of agricultural organic wastes..... | 236 |
| Matveev Yu.I., Averyanova E.V. Microcalorimetric investigation of amylopectin branching and the content of amylose in potato starches..... | 244 |
| Belkov V.I., Belogub K.E., Garnik E.Yu., Tarasenko V.I., Konstantinov Yu.M. The role of <i>Arabidopsis thaliana</i> photoreceptors in regulating the process of <i>state transitions</i> | 251 |
| Dyshlyuk L.S., Drozdova M.Yu., Loseva A.I. Study on safety profile in extracts of <i>Pulmonaria officinalis</i> callus cultures and their phytochemical composition for the presence bioactive substances with the potential geroprotective properties..... | 260 |
| Filipenko G.I., Adamovich S.N., Oborina E.N., Rozentsveig I.B., Safina G.F. Effects of protatranes on the germination of wheat and triticale seeds after their long-term storage..... | 272 |
| Ashurov A.I., Dzhonmuroov A.S., Usmanova S.R., Kholov S.E., Muhidinov Z.K. Characterization of polysaccharides from <i>Eremurus hissaricus</i> roots by FTIR spectroscopy..... | 281 |
| Sturova Y.u., Grishkova A.V., Konshin V.V. The effect of probiotic crops and lipolytic enzymes on the properties of dairy products in the cheese biotechnology under development..... | 290 |
| Kovekhova A.V., Arefieva O.D., Didenko N.A., Zemnukhova L.A. Composition of inorganic components in <i>Helianthus tuberosus</i> stems..... | 299 |
| Cherepanov I.S., Kamasheva A.A., Kashapova E.I. Synthesis and biological activity of N ⁶ -mannopyranosyladenines..... | 310 |

CHEMICAL TECHNOLOGY

| | |
|--|-----|
| Chugunov A.D., Filatova E.G. Adsorption of petroleum products by modified and activated adsorbents..... | 318 |
|--|-----|

BRIEF COMMUNICATION

| | |
|--|-----|
| Ushakov I.A., Nikonova V.S., Polynskii I.V., Knyazeva L.G., Polynskaya M.M., Antsiferov E.A. Study on efficiency of corrosion inhibitors based on derivatives of isothiuronc salts..... | 326 |
|--|-----|



Неподелённая электронная пара сурьмы как стереоэлектронный барьер на пути к стибатрану

© В.П. Барышок*, Э.А. Зельбст**

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

** Педагогический институт Иркутского государственного университета,
г. Иркутск, Российская Федерация

Резюме: С целью исследования влияния неподелённой электронной пары $5s^2$ атома сурьмы на результат реакции трифторида сурьмы с триэтаноломином в присутствии метилата натрия уточнена кристаллическая структура продукта реакции – 2-фтор-6-(2'-гидроксиэтил)-1,3-диокса-6-аза-2-стибацклооктана (1-фтор-2-гидростибатрана) $FSb(OCH_2CH_2)_2NCH_2CH_2OH$. В структуре данного соединения атом водорода 2-гидроксиэтильной группы каждой молекулы образует межмолекулярную водородную связь с кислородным атомом одного из пятичленных полуциклов $SbOCH_2CH_2N$ соседней молекулы. Геометрия обоих пятичленных гетероциклов N-C-C-O-Sb, замкнутых трансаннулярной связью $N \rightarrow Sb$ в молекуле 1-фтор-2-гидростибатрана, практически одинакова. Межатомные расстояния C–O, C–C, N–C и валентные углы в двух эндоциклических фрагментах (NCCOSb) соизмеримы с наблюдаемыми в силатранах $RSi(OCH_2CH_2)_3N$. Координационный полиэдр атома Sb может быть представлен как переходный от бисфеноида до тригональной пирамиды $Sb(O_3)N$ с атомом азота в вершине и тремя атомами кислорода в основании. Длина трансаннулярной координационной связи $N \rightarrow Sb$ равна 2,402(4) Å, что на 0,40 Å больше стандартной длины ковалентной связи Sb–N. Связь Sb–F (1,997(4) Å) на 0,12 Å длиннее, чем в молекуле SbF_3 , и значительно короче значения Sb–F_{ax} (2,028(3) Å) в кристаллическом комплексе $SbF_3 \cdot Gly$. Атом фтора существенно отклонен от оси $N \rightarrow Sb$ в сторону атомов O(1) и O(2). Атом кислорода 2-гидроксиэтильной группы отстоит от атома Sb на расстоянии 2,899(3) Å, промежуточном между длиной валентной связи и суммой ван-дер-ваальсовых радиусов этих атомов. Вкупе с положением атома F это позволяет предположить кристаллическую структуру 1-фтор-2-гидростибатрана как «замороженное» состояние нуклеофильной атаки атома кислорода типа S_Ni (Sb), незавершенной вследствие его отталкивания неподелённой электронной парой $5s^2$ атома сурьмы.

Ключевые слова: 2-фтор-6-(2'-гидроксиэтил)-1,3-диокса-6-аза-2-стибацклооктан, 1-фтор-2-гидростибатран, кристаллическая структура, межмолекулярная водородная связь, нуклеофильная атака типа S_Ni (Sb)

Благодарности: Авторы благодарят И.В. Стерхову, к.х.н., старшего научного сотрудника лаборатории структурных исследований Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, за уточнение экспериментальных данных кристаллической структуры.

Для цитирования: Барышок В.П., Зельбст Э.А. Неподелённая электронная пара сурьмы как стереоэлектронный барьер на пути к стибатрану. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 2. С. 178–186. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-178-186>

Antimony lone electronic pair as a stereoelectronic barrier to stibatrane

Viktor P. Baryshok*, Eleonora A. Zel'bst**

* Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

** Pedagogical Institute of Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: To examine the effect of $5s^2$ lone electron pair of antimony atom on the reaction of antimony trifluoride and triethanolamine in the presence of sodium methylate, the crystal structure of the reaction product -2-fluoro-6-(2-hydroxyethyl)-1,3-dioxo-6-aza-2-stibacy-cylooctane (1-fluoro-2-hydrostibatrane) $FSb(OCH_2CH_2)_2NCH_2CH_2OH$ was confirmed. In the compound structure, the hydrogen atom of the 2-hydroxyethyl group of each molecule forms an intermolecular hydrogen bond with the oxygen atom of one of the five-membered $SbOCH_2CH_2N$ half-

cycles in a neighbouring molecule. A geometry of both five-member N-C-C-O-Sb heterocycles, end-capped by transannular N → Sb bond in the 1-fluoro-2-hydrostibatrane molecule, is almost identical. C–O, C–C, N–C interatomic distances and valence angles in two endocyclic units (NCCOSb) are comparable to those observed in RSi(OCH₂CH₂)₃N silatranes. A coordination polyhedron of the Sb atom can be represented as a transition from a bisphenoid to Sb(O₃)N trigonal pyramid, with a nitrogen atom at the apex and three oxygen atoms in the base. The N → Sb transannular coordinate bond length is 2.402(4) Å, which is 0.40 Å greater than the Sb–N covalent bond standard length. The Sb–F bond (1.997(4) Å) is 0.12 Å longer than that in the SbF₃ molecule, and insignificantly shorter than that of the Sb–F_{ax} (2.028(3) Å) in the SbF₃·Gly crystalline complex. The fluorine atom substantially strays from the N→Sb axis to the direction of O(1) and O(2) atoms. The oxygen atom of the 2-hydroxyethyl group lies at a distance of 2.899(3) Å from that of Sb, intermediate between the valence bond length and the sum of the Van der Waals radii of these atoms. Combined with the F atom position, one can assume the 1-fluoro-2-hydrostibatrane crystal structure as a “frozen” state of the S_Ni(Sb) type nucleophilic attack of the oxygen atom, uncompleted because of its repulsion by the 5s² lone electronic pair of antimony atom.

Keywords: 2-fluoro-6-(2-hydroxyethyl)-1,3-dioxo-6-aza-2-stibacy-cylooctane, 1-fluoro-2-hydrostibatrane, crystal structure, intermolecular hydrogen bond, S_Ni(Sb) type nucleophilic attack

Acknowledgment: The authors are grateful to I.V. Sterkhov, Cand. Sci., Senior Researcher, Structural Research Laboratory, A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, for the refinement of the experimental data on the crystal structure.

For citation: Baryshok VP, Zel'bst EA. Antimony lone electronic pair as a stereoelectronic barrier to stibatrane. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):178–186. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-178-186>

ВВЕДЕНИЕ

Координационные соединения сурьмы(III) с различными лигандами [1–24] представляют интерес как с точки зрения их строения, так и биологической активности, особенно цитотоксических свойств, активно изучаемых в последние десятилетия [25–29].

Еще в 1966 г. Р. Мюллер заявил о синтезе внутрикомплексного соединения сурьмы – стибатрана Sb(OCH₂CH₂)₃N, реакцией расщепления силатранов трифторидом сурьмы [19]. Однако никаких сведений об этом соединении в последующем не появилось. При взаимодействии триэтилантимонита Sb(OC₂H₅)₃ с триэтанололамином N(CH₂CH₂OH)₃ образуется нерастворимое вещество неустановленного строения [20].

Взаимодействием трифторида сурьмы с триэтанололамином и метилатом натрия в среде метанола нами синтезирован 2-фтор-6-(2'-гидроксиэтил)-1,3-диокса-6-аза-2-стибациклооктан FSb(OCH₂CH₂)₂NCH₂CH₂OH и изучена его кри-

сталлическая структура [10, 14]. Однако в представленной ранее модели кристалла атом водорода у атома O(3) не был экспериментально определен.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Кристаллическая структура уточнена на рентгеновском дифрактометре Bruker D8 VENTURE. Параметры элементарной ячейки: $a = 7,6855(5)$ Å; $b = 9,9249(6)$; $c = 11,8199(9)$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$; пр. гр. P2₁2₁2₁; $V = 901,58(11)$ Å³; $T = 296$ К. Получены интенсивности 2638 независимых отражений (MoK α -излучение, поглощение учитывалось), окончательный фактор достоверности $R = 45\%$. Структура соединения депонирована в Кембриджском банке структурных данных, номер CCDC 1985064. Значения уточненных величин межатомных расстояний и валентных углов в сравнении с опубликованными ранее [10, 14] приведены в таблице.

Длины межатомных связей атомов (Å) и валентные углы (град.) в молекуле 1-фтор-2-гидростибатрана

Lengths of interatomic bonds of atoms (Å) and bond angles (degrees) in 1-fluoro-2-hydrostibatran molecule

| Связь | $d, \text{Å}$ | | Угол | $\omega, \text{град.}$ | |
|----------|---------------|-----------|---------|------------------------|----------|
| | эта работа | [14] | | эта работа | [14] |
| Sb1–F1 | 1,997(2) | 1,983(7) | F1Sb1O3 | 134,6(3) | 135,5(3) |
| Sb1–N1 | 2,402(3) | 2,406(7) | F1Sb1O2 | 82,8(1) | 82,4(3) |
| Sb1–O1 | 1,962(3) | 1,958(7) | O1Sb1O2 | 98,5(1) | 98,7(3) |
| Sb1–O2 | 2,003(3) | 2,019(7) | O2Sb1O3 | 141,9(3) | 141,7(2) |
| Sb1...O3 | 2,899(3) | 2,941(7) | O2Sb1N1 | 77,3(1) | 77,9(3) |
| O1–C1 | 1,421(6) | 1,425(13) | O1Sb1F1 | 83,9(1) | 84,8(3) |
| O2–C4 | 1,421(5) | 1,448(13) | Sb1O2C4 | 120,1(3) | 118,0(6) |

| | | | | | |
|-------|----------|-----------|---------|----------|----------|
| O3–C6 | 1,424(5) | 1,380(13) | Sb1O1C1 | 118,3(3) | 117,8(6) |
| C1–C2 | 1,522(5) | 1,517(13) | Sb1O3C6 | 108,6(4) | 107,5(6) |
| C2–N1 | 1,487(5) | 1,466(11) | Sb1N1C2 | 105,3(2) | 105,6(5) |
| C3–N1 | 1,483(5) | 1,481(11) | Sb1N1C3 | 102,8(1) | 102,9(5) |
| C4–C3 | 1,517(6) | 1,487(15) | Sb1N1C5 | 112,9(2) | 114,3(5) |
| C5–N1 | 1,485(5) | 1,481(11) | F1Sb1N1 | 150,1(1) | 150,7(3) |
| C6–C5 | 1,512(6) | 1,521(11) | N1Sb1O3 | 65,6(3) | 64,9(4) |
| | | | C2N1C3 | 112,4(3) | 111,7(7) |
| | | | O1C1C2 | 110,5(3) | 110,5(8) |
| | | | C2N1C5 | 113,8(3) | 112,6(7) |
| | | | O2C4C3 | 111,5(4) | 113,0(8) |
| | | | N1C2C1 | 109,7(3) | 109,9(7) |
| | | | N1C3C4 | 109,8(3) | 110,3(8) |
| | | | O3C6C5 | 111,8(3) | 114,0(8) |
| | | | N1C5C6 | 113,8(1) | 112,8(8) |
| | | | O1Sb1O3 | 81,8(3) | 82,5(3) |
| | | | O1Sb1N1 | 77,4(1) | 77,1(3) |

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее координационный полиэдр атома сурьмы в молекуле 2-фтор-6-(2'-гидроксиэтил)-1,3-диокса-6-аза-2-стибациклооктана был охарактеризован нами как пирамида с четырехатомным основанием (O(1)O(2)N(1)F(1)) и гидроксильным атомом кислорода в вершине [10] (рис. 1).

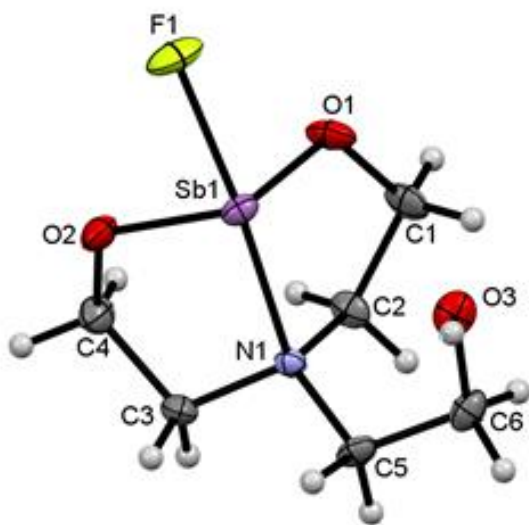


Рис. 1. Молекулярная структура 1-фтор-2-гидростибатрана (50% тепловые эллипсоиды)

Fig. 1. Molecular structure of 1-fluoro-2-hydrostibatrane (50% thermal ellipsoids)

В уточненной структуре $\text{FSb}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, для краткости названной нами 1-фтор-2-гидростибатраном [10], центральным атомом по-прежнему является сурьма.

Судя по геометрии пятичленных гетероциклов N(1)C(2)C(1)O(1)Sb(1) и NC(4)C(3)O(2)Sb(1), замкнутых трансаннулярной связью N→Sb, и межатомным расстояниям C–O, C–C, N–C в двух эндоциклических фрагментах (NCCOSb), соизмеримых с наблюдаемыми в силатранах $\text{RSi}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}$ и металлтранах типа $\text{O}_3\text{M} \leftarrow \text{N}$

[30, 31], представляется возможным в первом приближении рассмотреть полиэдр атома сурьмы в виде тригональной бипирамиды, в экваториальной плоскости которой располагаются три атома кислорода, а аксиальные позиции бипирамиды занимают атомы азота – N(1), и фтора – F(1) (см. рис. 1). Однако в отличие от металлтренов этот полиэдр значительно искажен. Искажение характеризуется лишь координационным контактом с атомом Sb атома кислорода 2-гидроксиэтильной группы, уменьшением углов N(1)-Sb(1)-O(1), N(1)-Sb(1)-O(2) и, особенно, O(1)-Sb(1)-O(2) ($98,5(1)^\circ$). Близко к последнему значению угла O(1)Sb(1)O(3), составляющее $81,8(3)^\circ$. В то же время угол O(2)Sb(1)O(3) намного больше – $141,9(3)^\circ$. Это обусловлено, очевидно, влиянием неподделённой электронной пары (НЭП) $5s^2$ атома сурьмы, занимающей экваториальное положение.

Ранее на примере молекул PX_3 и POX_3 показано, что способность к отталкиванию у НЭП атома фосфора больше, чем у связи P=O [32]. Отталкивание от НЭП атома O(3) в молекуле 1-фтор-2-гидростибатрана не позволяет атомам O(3) и Sb(1) сблизиться до образования валентной связи с отщеплением протона, тем самым «замораживая» контакт $\text{Sb}(1) \cdots \text{O}(3)$ на расстоянии, промежуточном между длиной валентной связи и суммой ван-дер-ваальсовых радиусов этих атомов (см. таблицу). Это, вероятно, и обуславливает выявленную ранее [10] подвижность атома водорода в растворах при повышенных температурах и склонность к сильному межмолекулярному связыванию с атомом кислорода O(1) соседней молекулы в кристаллической структуре 1-фтор-2-гидростибатрана (рис. 2).

Длина связи Sb–F ($1,997(4) \text{ \AA}$) незначительно короче значения Sb–F_{ax} ($2,028(3)$) в кристаллической молекуле комплекса SbF_3Gly [2]. Однако атом фтора, очевидно, вследствие стереоэлектронного давления атома O(3) на НЭП Sb, значительно отклонен в сторону атомов O(1) и O(2). Углы F(1)Sb(1)N(1), F(1)Sb(1)O(1), F(1)Sb(1)O(2) и F(1)Sb(1)O(3) составляют соответственно $150,1(1)$, $83,9(1)$, $82,8(1)$ и $134,6(3)^\circ$.

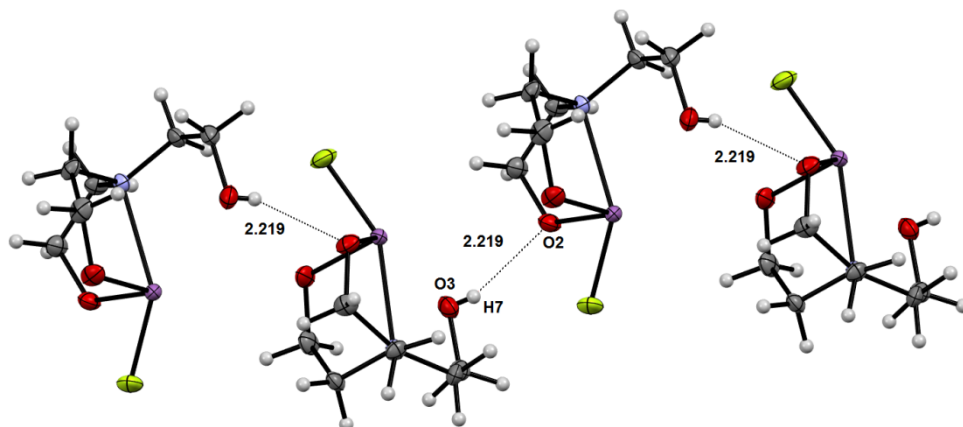


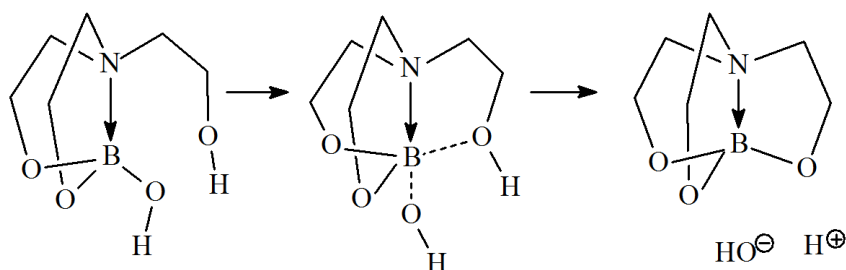
Рис. 2. Межмолекулярные водородные связи $\text{OH}\cdots\text{O}$ в кристалле 1-фтор-2-гидростибатрана

Fig. 2. Intermolecular $\text{OH}\cdots\text{O}$ hydrogen bonds in the crystal of 1-fluoro-2-hydrostibatrane

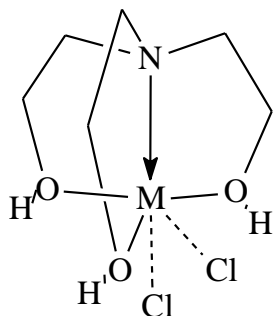
Несмотря на межмолекулярную водородную связь $\text{O}(1)\text{-H-O}(3)$, геометрия обоих пятичленных гетероциклов – $\text{NC}(2\text{C}(1)\text{O}(1)\text{Sb})$ и $\text{NC}(4)\text{C}(3)\text{O}(2)\text{Sb}$, в молекуле 1-фтор-2-гидростибатрана практически одинакова (см. таблицу). Отличающийся третий пятичленный гетероцикл $\text{N}(1)\text{C}(6)\text{C}(5)\text{O}(3)\text{Sb}(1)$ замкнут двумя координационными связями, $\text{N}(1)\rightarrow\text{Sb}(1)$ и $\text{O}(3)\rightarrow\text{Sb}(1)$. Длина трансаннулярной координационной связи $\text{N}\rightarrow\text{Sb}$ равна $2,402(4)$ Å, что лишь на $0,40$ Å больше стандартной длины ковалентной связи Sb-N [33]. Длина координационной связи $\text{O}(3)\rightarrow\text{Sb}(1)$ ($2,899(3)$ Å) почти на $1,0$ Å

больше длины валентных связей $\text{Sb}(1)\text{-O}(1)$ ($1,962(3)$ Å) и $\text{Sb}(1)\text{-O}(2)$ ($2,003(4)$ Å) и на $\sim 1,5$ Å меньше суммы ван-дер-ваальсовых радиусов атомов сурьмы и кислорода¹ [33, 34].

Координационный контакт атомов $\text{Sb}(1)$ и $\text{O}(3)$ может быть представлен как «замороженное» состояние нуклеофильной атаки атома кислорода на атом Sb типа $\text{S}_\text{N}i(\text{Sb})$ на пути к стибатрану, легко завершающейся при замыкании третьего атранового полукольца в атрановых системах вида $\text{O}_3\text{M}\leftarrow\text{N}$, например, при образовании боратрана ($\text{M} = \text{B}$):



Трициклические комплексы с триэтаноламином образуют также многие соли металлов, например, ZnCl_2 и CdCl_2 [35]:



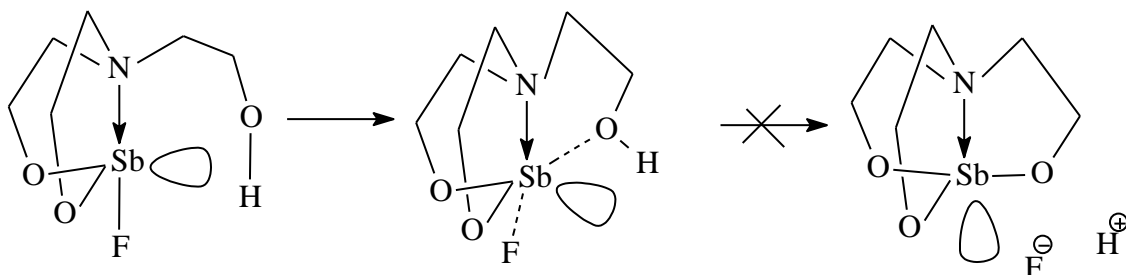
Примечательно, что в отличие от триэтаноламина трис(2-гидроксифенил)амин в реакции с триэтилантимонитом образует вещество, соответствующее брутто-формуле $3,4,7,8,10,11$ -трибензостибатрана $\text{Sb}(\text{OC}_6\text{H}_4\text{-o})_3\text{N}$ [12]. Из раствора в ДМСО это соединение кристаллизуется в виде комплекса $(\text{CH}_3)_2\text{SO}\rightarrow\text{Sb}(\text{OC}_6\text{H}_4\text{-o})_3\text{N}$, в кристаллической структуре которого полиэдр атома сурьмы представлен квадратной пирамидой с атомом азота в вершине и четырьмя атомами кислорода в основании. По-видимому, углеродные атомы фенильных колец в положениях 3, 4, 7, 8, 10, 11 занимают меньше пространства, чем метиленовые группы в атрановых фрагментах $\text{M-OCH}_2\text{CH}_2\text{-N}$.

¹Macgillavry C.H., Rieck G.D. International tables for X-ray crystallography. Vol. 3: Physical and chemical tables. Birmingham, England: Kynoch Press, 1962. P. 266.

В спектрах ЯМР ^1H металлтренов $\text{RM}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}$ и их аналогов $\text{R}_2\text{M}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NR}'$ вследствие конформационной подвижности конформационных полуколец М-О-С-С-Н, резонанс метиленовых протонов атранового остова наблюдается в виде пар триплетов, относящихся к вырожденной спиновой системе $3(\text{A}_2\text{M}_2)$ и $2(\text{A}_2\text{M}_2)$ соответственно [19, 36]. В спектрах ЯМР ^1H 1-фтор-2-гидростибатрана в CDCl_3 в интервале температур от -60 до 65°C протоны полуколец проявляются в виде мультиплетных сигналов, соответствующих спиновой системе $2(\text{ABMN})$, а в ациклическом фрагменте $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ – в виде двух триплетов, соответствующих спиновой системе $\text{A}'_2\text{M}'_2$ [10]. Это свидетельствует о том, что в атрановой системе $\text{Sb}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{N}$ с экваториальным расположением НЭП Sb конформационная подвижность полуколец Sb-O-C-C-N затруднена, а координационный контакт $\text{O}(3) \rightarrow \text{Sb}(1)$ легко мигрирует по обеим сторонам НЭП Sb, усредняя химические сдвиги протонов в группах OCH_2 и NCH_2 . На тесное расположение полуколец указывает величина угла $\text{O}(1)\text{Sb}(1)\text{O}(2) - 98,5^\circ$, в то время

как в кристаллах силатранов значения углов OSiO составляют $118-120^\circ$ [30]. Угол $\text{O}(1)\text{Sb}(1)\text{O}(3)$ меньше 90° , а $\text{O}(2)\text{Sb}(1)\text{O}(3)$ составляет $141,9^\circ$, что визуализирует положение НЭП Sb между этими атомами кислорода. При этом геометрия валентного окружения вокруг атома азота в 1-фтор-2-гидростибатране даже ближе к тетраэдрическому, чем в силатранах с сильной координационной связью $\text{Si} \leftarrow \text{N}$ (углы C-N-C в среднем составляют соответственно $111,2$ и $113-114^\circ$ [30]).

Наблюдающаяся в спектре ЯМР ^1H 1-фтор-2-гидростибатрана при температуре от 75 до 120°C в DMCO-d_6 прототропная таутомерия с попеременной быстрой миграцией протона (разрывом-восстановлением гетероциклических связей Sb-O) осуществляется, по-видимому, с разрывом координации $\text{N}(1) \rightarrow \text{Sb}(1)$ [10]. Однако это не способствует завершению реакции с разрывом связи Sb-F и смещением НЭП Sb в аксиальное положение, что свидетельствует о значительном энергетическом барьере на пути этого превращения:



Межмолекулярное взаимодействие в элементарной ячейке кристалла и положение атома F в молекулах иллюстрирует рис. 2. В кристалле можно выделить цепочки, сформированные посредством межмолекулярных водородных связей $\text{OH} \cdots \text{O}$ длиной $2,219 \text{ \AA}$. Атом водорода H(7) находится почти на линии, соединяющей атомы O(2) и O(3) ($2,756(3) \text{ \AA}$) соседних молекул, угол $\text{O}(2)\text{H}(7)\text{O}(3)$ равен $158,5^\circ$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В кристаллической структуре 1-фтор-2-гидростибатрана межмолекулярная водородная связь атома водорода 2-гидроксиэтильной груп-

пы каждой молекулы с кислородным атомом одного из пятичленных циклов $\text{Sb-OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ соседней молекулы является, по-видимому, следствием внутримолекулярной координации $\text{O}_3 \rightarrow \text{Sb}(1)$, уменьшающей степень связывания атомов O(3) и H(7). Координационный контакт атомов Sb(1) и O(3) может быть представлен как незавершенная нуклеофильная атака атома кислорода на атом Sb типа S_Ni , а полиэдр атома сурьмы – как переходный от бисфеноида до тригональной пирамиды $\text{Sb}(\text{O}_3)\text{N}$ с атомом азота в вершине и тремя атомами кислорода в основании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Voit E.I., Udovenko A.A., Kovaleva E.V., Makarenko N.V., Zemnukhova L.A., Beleneva I.A. Structure and properties of the molecular complex of antimony(III) fluoride with γ -glycine // Journal of Structural Chemistry. 2019. Vol. 60. Issue 4. P. 630–639. <https://doi.org/10.1134/S0022476619040140>
2. Ковалева Е.В., Макаренко Н.В., Удовенко А.А., Земнухова Л.А. Синтез, строение и свойства фторидных комплексных соединений сурьмы(III) с аминокислотами // Вестник Дальнево-

сточного отделения Российской академии наук. 2019. N 6 (208). С. 5–22. <https://doi.org/10.25808/08697698.2019.208.6.001>

3. Udovenko A.A., Makarenko N.V., Kovaleva E.V., Zemnukhova L.A. Crystal structure of DL-valinium tetrafluoroantimonate(III) monohydrate // Journal of Structural Chemistry. 2018. Vol. 59. Issue 7. P. 1653–1657. <https://doi.org/10.1134/S0022476618070181>
4. Udovenko A.A., Makarenko N.V., Kovaleva E.V., Zemnukhova L.A. Crystal structure of DL-serinium

- heptafluorodiantimonate(III) // Journal of Structural Chemistry. 2018. Vol. 59. Issue 6. P. 1421–1426. <https://doi.org/10.1134/S0022476618060240>
5. Benjamin S.L., Burt J., Levason W., Reid G., Webster M. Synthesis and structures of antimony trifluoride complexes with N-heterocyclic ligands // Journal of Fluorine Chemistry. 2012. Vol. 135. P. 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2011.09.007>
6. Udovenko A.A., Makarenko N.V., Davidovich R.L., Zemnukhova L.A., Kovaleva E.V. Crystal structure of the molecular adduct of antimony(III) fluoride with L-phenylalanine // Journal of Structural Chemistry. 2011. Vol. 52. Issue 3. P. 616–620. <https://doi.org/10.1134/S0022476611030243>
7. Khan M., Gul S., Hussain I., Khan M.A., Ashfaq M., Inayat-Ur-Rahman, et al. *In vitro* anti-leishmanial and anti-fungal effects of new Sb(III) carboxylates // Organic and Medicinal Chemistry Letters. 2011. Vol. 1. Issue 2. 7 p. <https://doi.org/10.1186/2191-2858-1-2>
8. Udovenko A.A., Davidovich R.L., Zemnukhova L.A., Kovaleva E.V., Makarenko N.V. Crystal structure of DL-serinium tetrafluoroantimonate(III) // Journal of Structural Chemistry. 2010. Vol. 51. Issue 3. P. 540–544. <https://doi.org/10.1007/s10947-010-0078-z>
9. Udovenko A.A., Makarenko N.V., Davidovich R.L., Zemnukhova L.A., Kovaleva E.V. Crystal structure of L-leucinium tetrafluoroantimonate(III) // Journal of Structural Chemistry. 2010. Vol. 51. Issue 5. P. 904–908. <https://doi.org/10.1007/s10947-010-0137-5>
10. Voronkov M.G., Pestunovich V.A., Albanov A.I., Kuznetsova G.A., Selbst É.A., Baryshok V.P. 1-Fluoro-2-hydrostibatrane // Journal of Structural Chemistry. 2006. Vol. 47. Issue 3. P. 527–531. <https://doi.org/10.1007/s10947-006-0332-6>
11. Zemnukhova L.A., Davidovich R.L., Udovenko A.A., Kovaleva E.V. Sb(III) fluoride complexes with DL-valine. Crystal structure of molecular complex $\text{SbF}_3\{(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_3)\text{COO}-\}$ // Russian Journal of Coordination Chemistry. 2005. Vol. 31. Issue 2. P. 115–120. <https://doi.org/10.1007/S11173-005-0040-3>
12. Tanski J.M., Kelly B.V., Parkin G. Multidentate aryloxide and oxo-aryloxide complexes of antimony: synthesis and structural characterization of $[\eta^4\text{-N}(\text{o-C}_6\text{H}_4\text{O})_3\text{Sb}(\text{OSMe}_2)]$, $\{[\eta^3\text{-N}(\text{o-C}_6\text{H}_4\text{OH})(\text{o-C}_6\text{H}_4\text{O})_2\text{Sb}]_2(\mu^2\text{-O})_2\}$ and $\{[\eta^3\text{-PhN}(\text{o-C}_6\text{H}_4\text{O})_2\text{Sb}]_4(\mu^3\text{-O})_2\}$ // Dalton Transactions. 2005. Issue 14. P. 2442–2447. <https://doi.org/10.1039/b505308k>
13. Udovenko A.A., Zemnukhova L.A., Kovaleva E.V., Davidovich R.L. Crystal structure of monohydrate and anhydrous β -alaninium tetrafluoroantimonates(III) // Russian Journal of Coordination Chemistry. 2005. Vol. 31. Issue 4. P. 225–229. <https://doi.org/10.1007/s11173-005-0081-7>
14. Voronkov M.G., Pestunovich V.A., Zelbst E.A., Kashaev A.A., Fundamenskiy V.S., Albanov A.I., et al. The puzzle of stibatrane: $(\text{O}\rightarrow\text{Sb}\leftarrow\text{N})\text{-2-Fluoro-6-}$ (2"-hydroxyethyl)-1,3-dioxo-6-aza-2-stibacyclooctane // Doklady Chemistry. 2001. Vol. 381. Issue 4-6. P. 344–346. <https://doi.org/10.1023/A:1013316824768>
15. Singh A.K., Amburosea C.V., Jha N.K., Sharma P., Cabrera A., Espinosa-Perz G. [Tetra(n-butyl)ammonium] [di(μ -bromo) bis{dichloro(p-tolyl)antimonate(III)}]: synthesis and crystal structure // Journal of Chemical Research. 2000. Issue 4. P. 198–199. <https://doi.org/10.3184/030823400103166959>
16. Zemnukhova L.A., Davidovich R.L. 121,123Sb NQR study of antimony(III) fluoride complexes // Russian Chemical Bulletin. 1998. Vol. 47. Issue 11. P. 2164–2168. <https://doi.org/10.1007/BF02494273>
17. Battaglia L.P., Corradi A.B., Pelosi G., Cantoni A., Alonzo G., Bertazzi N. Crystal and molecular structure of antimony trifluoride-terpyridine 1:1 adduct: a case of pseudo-pentagonal-bipyramidal geometry // Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions. 1991. Vol. 11. P. 3153–3155. <https://doi.org/10.1039/DT9910003153>
18. Abboud K.A., Palenik R.C., Palenik G.J., Wood R.M. Syntheses and structures of four antimony complexes with planar tridentate pyridine ligands // Inorganica Chimica Acta. 2007. Vol. 360. Issue 11. P. 3642–3646. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2007.05.007>
19. Voronkov M.G., Baryshok V.P. Metallatrane // Journal of Organometallic Chemistry. 1982. Vol. 239. Issue 1. P. 199–249.
20. Bradiey D.C., Gaur D.P., Mehrotra R.C. Metal Alkoxides. London: Academic Press, 1978. 411 p.
21. Müller R. The splitting of the 1-organyl-silatranes by metal fluorides // Organometallic Chemistry Reviews. 1966. Vol. 1. P. 359.
22. Das R., Pani S. Trichloromonopyridineantimony complex // Journal of the Indian Chemical Society. 1954. Vol. 33. P. 538.
23. Keogan D.M., Oliveira S.S.C., Sangenito L.S., Branquinha M.H., Jagoo R.D., Twamley B., et al. Novel antimony(III) hydroxamic acid complexes as potential anti-leishmanial agents // Dalton Transactions. 2018. Vol. 47. Issue 21. P. 7245–7255. <https://doi.org/10.1039/C8DT00546j>
24. Urgut O.S., Ozturk I.I., Banti C.N., Kourkoumelis N., Manol M., Tasiopoulos A.J., et al. New antimony(III) halide complexes with dithiocarbamate ligands derived from thiuram degradation: The effect of the molecule's close contacts on *in vitro* cytotoxic activity // Materials Science and Engineering: C. 2016. Vol. 58. P. 396–408. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.030>
25. Hadjikakou S.K., Ozturk I.I., Banti C.N., Kourkoumelis N., Hadjiladis N. Recent advances on antimony(III/V) compounds with potential activity against tumor cells // Journal of Inorganic Biochemistry. 2015. Vol. 153. P. 293–305. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.06.006>
26. Ozturk I.I., Ürgüt O., Banti C.N., Kourkoume-

lis N., Owczarzak A.M., Kubicki M., et al. Synthesis, structural characterization and cytostatic properties of N,N-dicyclohexyldithiooxamide complexes of antimony(III) halides (SbX_3 , X: Br or I) // *Polyhedron*. 2014. Vol. 70. P. 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2013.12.025>

27. Tiekink E.P.T. Anticancer activity of molecular compounds of arsenic, antimony and bismuth. In: *Biological chemistry of arsenic, antimony and bismuth*. Ed. Sun. H. Chichester. UK: John Wiley & Sons Ltd, 2011, pp. 293–310. <https://doi.org/10.1002/9780470975503.ch12>

28. Ковалева Е.В., Земнухова Л.А. Экоотоксикологические свойства комплексных фторидных соединений сурьмы(III) // *Вестник Томского государственного университета. Химия*. 2019. N 13. С. 28–41. <https://doi.org/10.17223/24135542/13/4>

29. Adeyemi J.O., Onwudiwe D.C. Chemistry and Some Biological Potential of Bismuth and Antimony Dithiocarbamate Complexes // *Molecules*. 2020. Vol. 25. Issue 2. P. 305–326. <https://doi.org/10.3390/molecules25020305>

30. Pestunovich V.K., Kirpichenko S.V., Voronkov M.G. Silatranes and their tricyclic analogs. In: Saul P., Rappoport Z., Apeloig Y. (eds.) *Chemistry of organic silicon compounds*. Vol 2. Part 2. Chichester: Wiley, 1998, pp 1447–1537.

31. Sterkhova I.V., Smirnov V.I., Kuznetsova G.A.,

Zel'bst E.A. Crystal and molecular structure of 1-(iodomethyl)- and 1-(iodopropyl)silatranes // *Journal of Structural Chemistry*. 2016. Vol. 57. Issue 1. P. 209–212. <https://doi.org/10.1134/S0022476616010285>

32. Харгиттаи М., Харгиттаи И. Геометрия молекул координационных соединений в паробразной фазе / пер. с англ. В.П. Спиридонова. М.: Мир, 1976. 248 с.

33. Pauling L. *The nature of the chemical bond*. Ithaca: Cornell University Press, 1960. 644 p.

34. Бацанов С.С. Атомные радиусы элементов // *Журнал неорганической химии*. 1991. Т. 36. N 12. С. 3015–3037.

35. Воронов В.К., Дударева О.В., Фунтикова Е.А. Исследования комплексов $ZnCl_2$ и $CdCl_2$ с триэтаноламином методами спектроскопии ЯМР и квантовой химии // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 4. С. 548–555. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-548-555>

36. Kupce E., Liepiņš E., Lukevics E. The conflict between the conformational properties of the eight-membered heterocycle and trigonal bipyramid of fire-coordinated silicon in 1,3-dioxo-6-aza-2-silacyclooctanes // *Journal of Organometallic Chemistry*. 1983. Vol. 248. Issue 2. P. 131–147. [https://doi.org/10.1016/0022-328X\(83\)85020-7](https://doi.org/10.1016/0022-328X(83)85020-7)

REFERENCES

1. Voit EI, Udovenko AA, Kovaleva EV, Makarenko NV, Zemnukhova LA, Beleneva IA. Structure and properties of the molecular complex of antimony(III) fluoride with γ -glycine. *Journal of Structural Chemistry*. 2019;60(4):630–639. <https://doi.org/10.1134/S0022476619040140>

2. Kovaleva EV, Makarenko NV, Udovenko AA, Zemnukhova LA. Synthesis, structure and properties of antimony(III) fluoride complexes with amino acids. *Vestnik Dal'nevostochnogo otdeleniya Rossiiskoi akademii nauk = Vestnik of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences*. 2019; 6:5–22. <https://doi.org/10.25808/08697698.2019.20.8.6.001> (In Russian)

3. Udovenko AA, Makarenko NV, Kovaleva EV, Zemnukhova LA. Crystal structure of DL-valinium tetrafluoroantimonate(III) monohydrate. *Journal of Structural Chemistry*. 2018;59(7):1653–1657. <https://doi.org/10.1134/S0022476618070181>

4. Udovenko AA, Makarenko NV, Kovaleva EV, Zemnukhova LA. Crystal structure of DL-serinium heptafluorodiantimonate(III). *Journal of Structural Chemistry*. 2018;59(6):1421–1426. <https://doi.org/10.1134/S0022476618060240>

5. Benjamin SL, Burt J, Levason W, Reid G, Webster M. Synthesis and structures of antimony trifluoride complexes with N-heterocyclic ligands. *Journal of Fluorine Chemistry*. 2012;135:108–113. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2011.09.007>

6. Udovenko AA, Makarenko NV, Davidovich RL,

Zemnukhova LA, Kovaleva EV. Crystal structure of the molecular adduct of antimony(III) fluoride with L-phenylalanine. *Journal of Structural Chemistry*. 2011;52(3): 616–620. <https://doi.org/10.1134/S0022476611030243>

7. Khan M, Gul S, Hussain I, Khan MA, Ashfaq M, Inayat-Ur-Rahman, et al. *In vitro* anti-leishmanial and anti-fungal effects of new Sb(III) carboxylates. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*. 2011;1(2). 7 p. <https://doi.org/10.1186/2191-2858-1-2>

8. Udovenko AA, Davidovich RL, Zemnukhova LA, Kovaleva EV, Makarenko NV. Crystal structure of DL-serinium tetrafluoroantimonate(III). *Journal of Structural Chemistry*. 2010;51(3):540–544. <https://doi.org/10.1007/s10947-010-0078-z>

9. Udovenko AA, Makarenko NV, Davidovich RL, Zemnikhova LA, Kovaleva EV. Crystal structure of L-leucinium tetrafluoroantimonate(III). *Journal of Structural Chemistry*. 2010;51(5):904–908. <https://doi.org/10.1007/s10947-010-0137-5>

10. Voronkov MG, Pestunovich VA, Albanov AI, Kuznetsova GA, Selbst ÉA, Baryshok VP. 1-Fluoro-2-hydrostibatrane. *Journal of Structural Chemistry*. 2006;47(3):527–531. <https://doi.org/10.1007/s10947-006-0332-6>

11. Zemnukhova LA, Davidovich RL, Udovenko AA, Kovaleva EV. Sb(III) fluoride complexes with DL-valine. Crystal structure of molecular complex $SbF_3\{(CH_3)_2CHCH(+NH_3)COO-\}$. *Russian Journal of Coordination Chemistry*. 2005;31(2):115–120. <https://doi.org/10.1007/s10947-005-0115-2>

//doi.org/10.1007/S11173-005-0040-3

12. Tanski JM, Kelly BV, Parkin G. Multidentate aryloxide and oxo-aryloxide complexes of antimony: synthesis and structural characterization of $[\eta^4\text{-N}(\text{o-C}_6\text{H}_4\text{O})_3\text{Sb}(\text{OSMe}_2)_2]$, $\{[\eta^3\text{-N}(\text{o-C}_6\text{H}_4\text{OH})(\text{o-C}_6\text{H}_4\text{O})_2\text{Sb}]_2(\mu^2\text{-O})\}_2$ and $\{[\eta^3\text{-PhN}(\text{o-C}_6\text{H}_4\text{O})_2\text{Sb}]_4(\mu^3\text{-O})_2\}$. *Dalton Transactions*. 2005;14:2442–2447. <https://doi.org/10.1039/b505308k>

13. Udovenko AA, Zemnukhova LA, Kovaleva EV, Davidovich RL. Crystal structure of monohydrate and anhydrous β -alaninium tetrafluoroantimonates(III). *Russian Journal of Coordination Chemistry*. 2005;31(4):225–229. <https://doi.org/10.1007/s11173-005-0081-7>

14. Voronkov M.G., Pestunovich V.A., Zelbst E.A., Kashaev A.A., Fundamenskiy V.S., Albanov A.I., et al. The puzzle of stibatrane: (O→Sb←N)-2-Fluoro-6-(2"-hydroxyethyl)-1,3-dioxo-6-aza-2-stibacyclooctane // *Doklady Chemistry*. 2001. Vol. 381. Issue 4-6. P. 344–346. <https://doi.org/10.1023/A:1013316824768>

15. Singh AK, Amburosea CV, Jha NK, Sharma P, Cabrera A, Espinosa-Perz G. [Tetra(n-butyl)ammonium] [di(μ-bromo) bis{dichloro(p-tolyl)antimonate(III)}]: synthesis and crystal structure. *Journal of Chemical Research*. 2000;4:198–199. <https://doi.org/10.3184/030823400103166959>

16. Zemnukhova LA, Davidovich RL. 121,123Sb NQR study of antimony(III) fluoride complexes. *Russian Chemical Bulletin*. 1998;47(11):2164–2168. <https://doi.org/10.1007/BF02494273>

17. Battaglia LP, Corradi AB, Pelosi G, Cantoni A, Alonzo G, Bertazzi N. Crystal and molecular structure of antimony trifluoride-terpyridine 1:1 adduct: a case of pseudo-pentagonal-bipyramidal geometry. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. 1991;11:3153–3155. <https://doi.org/10.1039/DT9910003153>

18. Abboud KA, Palenik RC, Palenik GJ, Wood RM. Syntheses and structures of four antimony complexes with planar tridentate pyridine ligands. *Inorganica Chimica Acta*. 2007;360(11):3642–3646. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2007.05.007>

19. Voronkov MG, Baryshok VP. Metallatranes. *Journal of Organometallic Chemistry*. 1982;239(1):199–249.

20. Bradley DC, Gaur DP, Mehrotra RC. *Metal Alkoxides*. London: Academic Press; 1978. 411 p.

21. Müller R. The splitting of the 1-organylsilatranes by metal fluorides. *Organometallic Chemistry Reviews*. 1966;1:359.

22. Das R, Pani S. Trichloromonopyridineantimony complex. *Journal of the Indian Chemical Society*. 1954;33:538.

23. Keogan DM, Oliveira SSC, Sangenito LS, Branquinha MH, Jagoo RD, Twamley B, et al. Novel antimony(III) hydroxamic acid complexes as potential anti-leishmanial agents. *Dalton Transactions*. 2018;47(21):7245–7255. <https://doi.org/10.1039/C8DT00546j>

24. Urgut OS, Ozturk II, Banti CN, Kourkoumelis

N, Manol M, Tasiopoulos AJ, et al. New antimony(III) halide complexes with dithiocarbamate ligands derived from thiuram degradation: The effect of the molecule's close contacts on in vitro cytotoxic activity. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;58:396–408. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.030>

25. Hadjikakou SK, Ozturk II, Banti CN, Kourkoumelis N, Hadjiliadis N. Recent advances on antimony(III/IV) compounds with potential activity against tumor cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2015;153:293–305. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.06.006>

26. Ozturk I.I., Ürgüt O., Banti C.N., Kourkoumelis N., Owczarzak A.M., Kubicki M., et al. Synthesis, structural characterization and cytostatic properties of N,N-dicyclohexyldithiooxamide complexes of antimony(III) halides (SbX₃, X: Br or I) // *Polyhedron*. 2014. Vol. 70. P. 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2013.12.025>

27. Tiekink EPT. Anticancer activity of molecular compounds of arsenic, antimony and bismuth. In: Sun H. (ed.) *Biological chemistry of arsenic, antimony and bismuth*. Chichester. UK: John Wiley & Sons Ltd; 2011, chapter 12, pp. 293–310. <https://doi.org/10.1002/9780470975503.ch12>

28. Kovaleva EV, Zemnukhova LA. Ecotoxicological properties of antimony (III) complex fluoride compounds. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Khimiya = Tomsk State University Journal of Chemistry*. 2019;13:28–41. (In Russian) <https://doi.org/10.17223/24135542/13/4>

29. Adeyemi JO, Onwudiwe DC. Chemistry and Some Biological Potential of Bismuth and Antimony Dithiocarbamate Complexes. *Molecules*. 2020;25(2):305–326. <https://doi.org/10.3390/molecules25020305>

30. Pestunovich VK, Kirpichenko SV, Voronkov MG. Silatranes and their tricyclic analogs. In: Saul P, Rappoport Z, Apeloig Y. (eds.). *Chemistry of organic silicon compounds*. Vol 2. Part 2. Chichester: Wiley; 1998, p.1447–1537.

31. Sterkhova IV, Smirnov VI, Kuznetsova GA, Zel'bst EA. Crystal and molecular structure of 1-(iodomethyl)- and 1-(iodopropyl)silatranes. *Journal of Structural Chemistry*. 2016;57(1):209–212. <https://doi.org/10.1134/S0022476616010285>

32. Hargittai M, Hargittai I. *The molecular geometries of coordination compounds in vapour phase*. (Russ. ed.: Hargittai M, Hargittai I. *Geometriya molekul koordinatsionnykh soedinenii v paroobraznoi faze*. Moscow: Mir; 1976. 248 p.)

33. Pauling L. *The nature of the chemical bond*. Ithaca: Cornell University Press; 1960. 644 p.

34. Batsanov SS. Atomic radii of the element. *Zhurnal neorganicheskoi khimii = Russian Journal of Inorganic Chemistry*. 1991;36(12):3015–3037. (In Russian)

35. Voronov VK, Dudareva OV, Funtikova EA. Research into complexes of triethanolamine with

ZnCl₂ and CdCl₂ using NMR Spectroscopy and Quantum Chemistry methods. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):548–555. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-548-555>

36. Kupce E, Liepiņš E, Lukevics E. The conflict

between the conformational properties of the eight-membered heterocycle and trigonal bipyramid of fire-coordinated silicon in 1,3-dioxo-6-aza-2-silacyclooctanes. *Journal of Organometallic Chemistry*. 1983;248(2):131–147. [https://doi.org/10.1016/0022-328X\(83\)85020-7](https://doi.org/10.1016/0022-328X(83)85020-7)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Барышок Виктор Петрович,

д.х.н., профессор, профессор кафедры химической технологии, Иркутский национальный исследовательский технический университет, 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83, Российская Федерация, ✉ e-mail: baryvik@yandex.ru

Зельбст Элеонора Абрамовна,

к.х.н., доцент кафедры физики, Педагогический институт, Иркутский государственный университет, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1, Российская Федерация, e-mail: zelbst@rambler.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

*Поступила в редакцию 02.12.2020.
Одобрена после рецензирования 14.02.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Viktor P. Baryshok,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Chemical Technology Department, Irkutsk National Research Technical University, 83, Lermontov St., Irkutsk, 664074, Russian Federation, ✉ e-mail: baryvik@yandex.ru

Eleonora A. Zel'bst,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor, Physics Department, Pedagogical Institute, Irkutsk State University, 1, K. Marks St., Irkutsk, 664003, Russian Federation, e-mail: zelbst@rambler.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

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

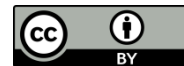
The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

*The article was submitted 02.12.2020.
Approved after reviewing 14.02.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 620.197:669.017

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-187-194>



Анодное поведение сплава Zn_{0.5}Al, легированного молибденом, в кислых, нейтральных и щелочных средах

© З.Р. Обидов, П.Р. Иброхимов, Ф.А. Рахимов, И.Н. Ганиев

Институт химии им. В.И. Никитина АН Республики Таджикистан,
г. Душанбе, Республика Таджикистан

Резюме: Приведены результаты потенциодинамического исследования анодного поведения цинкового сплава Zn_{0.5}Al, легированного молибденом в кислых (0,1 М, рН = 1; 0,01 М, рН = 2; 0,001 М, рН = 3), нейтральных (0,03, 0,3, 3%; рН = 7) и щелочных (0,001 М, рН = 10; 0,01 М, рН = 11; 0,1 М, рН = 12) средах электролитов HCl, NaCl и NaOH. В потенциодинамическом режиме со скоростью развертки электродного потенциала 2 мВ/с выявлено, что для всех образцов сплавов Zn_{0.5}Al-Mo, содержащих от 0,01 до 1,0% масс. молибдена, наблюдается смещение потенциалов коррозии, питтингообразования и репассивации, причем в кислых и щелочных средах происходит смещение в область отрицательных значений, в нейтральной среде – в область положительных значений. Установлено, что при повышении концентрации электролитов рассматриваемые потенциалы значительно смещаются в область отрицательных значений во всех средах – кислых, нейтральных и щелочных. Данная зависимость связана с особенностями механизма анодного растворения сплавов по мере формирования оксидной пленки на их поверхности. Показана важная роль зависимости стационарного потенциала свободной коррозии сплавов от времени в установлении пассивности поверхности в кислых, нейтральных и щелочных средах. Определено, что цинковые сплавы, легированные молибденом, устойчивы к питтинговой коррозии во всех исследованных средах. Особенно высокой оказывается устойчивость в кислой (0,001 М), нейтральной (0,03%) и щелочной (0,001 М) средах электролитов HCl, NaCl и NaOH. Показано благоприятное влияние молибдена на анодное поведение цинкового сплава Zn_{0.5}Al и повышение коррозионной стойкости сплавов в целом. Скорость коррозии легированных (0,01–1,0% масс.) молибденом сплавов в 2–2,5 раза меньше, чем у нелегированного сплава Zn_{0.5}Al. Предложенные составы сплавов Zn_{0.5}Al-Mo могут использоваться в качестве протекторов для защиты от коррозии стальных изделий и конструкций.

Ключевые слова: сплав Zn_{0.5}Al с молибденом; кислая, нейтральная и щелочная среды; потенциалы коррозии и питтингообразования; потенциодинамическое исследование; скорость коррозии; анодное поведение сплавов

Для цитирования: Обидов З.Р., Иброхимов П.Р., Рахимов Ф.А., Ганиев И.Н. Анодное поведение сплава Zn_{0.5}Al, легированного молибденом, в кислых, нейтральных и щелочных средах. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 2. С. 187–194. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-187-194>

Anodic behaviour of Zn_{0.5}Al doped with molybdenum in acidic, neutral and alkaline media

Ziyodullo R. Obidov, Pairav R. Ibrohimov, Firuz A. Rahimov, Izatullo N. Ganiev

V.I. Nikitin Institute of Chemistry, National Academy of Sciences of Tajikistan,
Dushanbe, Republic of Tajikistan

Abstract: The paper presents the results of a potentiodynamic study of the anodic behaviour of Zn_{0.5}Al doped with molybdenum in the acidic (0.1 M, pH = 1; 0.01 M, pH = 2; 0.001 M, pH = 3), neutral (0.03, 0.3, 3%, pH = 7) and alkaline (0.001 M, pH = 10; 0.01 M, pH = 11; 0.1 M, pH = 12) media of HCl, NaCl and NaOH electrolytes. In the potentiodynamic mode with an electrode potential sweep rate of 2 mV/s, all Zn_{0.5}Al-Mo samples containing from 0.01 to 1.0 wt% of molybdenum demonstrated a shift in the potentials of corrosion, pitting formation and repassivation. These potentials shift towards negative values in acidic and alkaline media, while shifting to positive values in a neutral medium. It was established that an increase in

the concentration of electrolytes led to a shift of all the considered potentials towards negative values in all media – acidic, neutral and alkaline. This dependence is associated with the specific features of the process of anodic dissolution of alloys during the formation of an oxide film on their surface. The significance of the dependence of the stationary potential of free corrosion of alloys on time for establishing the passivity of surfaces in acidic, neutral and alkaline media was shown. It was determined that zinc alloys doped with molybdenum are resistant to pitting corrosion in all the investigated media. This resistivity is particularly high in acidic (0.001 M), neutral (0.03%) and alkaline (0.001 M) media of HCl, NaCl and NaOH electrolytes. The favourable effect of molybdenum on both the anodic behaviour of Zn0.5Al and the overall increase in the corrosion resistance of alloys was demonstrated. In comparison with undoped Zn0.5Al alloys, the corrosion rate of alloys doped with molybdenum (0.01–1.0 wt%) is 2–2.5 times lower. The proposed compositions of Zn0.5Al-Mo alloys can be used as noncorrosive coatings for steel products.

Keywords: molybdenum-doped Zn0.5Al alloys; acidic, neutral and alkaline medium; corrosion and pitting potential; potentiodynamic study; corrosion rate; anodic behaviour of alloys

For citation: Obidov ZR, Ibrohimov PR, Rahimov FA, Ganiev IN. Anodic behaviour of Zn0.5Al doped with molybdenum in acidic, neutral and alkaline media. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):187–194. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-187-194>

ВВЕДЕНИЕ

Цинк наиболее часто используется в электрохимических производствах металлопокрытий. До 40% мировых запасов цинка расходуется для защиты металлоконструкций от коррозии. Цинковые покрытия относятся к анодным и защищают стальные поверхности электрохимически. В атмосферных условиях поверхность цинка тускнеет вследствие образования тонкого слоя оксида, защищающего металл от дальнейшего окисления¹ [1, 2].

В настоящее время для защиты от коррозии изделий из стали и чугуна применяются металлические покрытия на основе цинковых и алюминиевых сплавов, наносимые на поверхность изделий различными методами [3–6]. Наиболее универсальными и распространенными являются цинк-алюминиевые покрытия типа «Гальфан-1» и «Гальфан-2» (сплавы цинка с 5 и 55% масс. алюминия) с высокими защитными свойствами, которые можно наносить горячим методом путем погружения стальных конструкций в расплав покрывающего металла [7–9]. С целью повышения коррозионной стойкости гальфановых покрытий разработаны новые защитные цинк-алюминиевые покрытия с указанными металлами [10–12]. Имеются сведения об анодном поведении данных сплавов в кислых, нейтральных и щелочных средах [13–15]. Установлена эффективность их легирования третьими компонентами [16–19].

В работе [20] сообщается об особенностях получения и преимуществах использования электрохимических покрытий из сплавов цинка с молибденом и оловом. Исследованы особенности нанесения покрытий Zn-Mo и Zn-Sn и сплавов на основе каждого из этих металлов. Выяв-

лено, что такие покрытия имеют преимущества по сравнению с покрытиями, образованными только одним из металлов. Введение небольшого количества молибдена в состав цинкового покрытия в процессе электролиза дает возможность получать покрытия Zn-Mo-сплавов, которые отличаются более высокой защитной способностью, чем только цинковые покрытия [21]. Показана эффективность их использования в атмосферных условиях повышенной жесткости (морские среды, приморские зоны, тропики и другие факторы внешней среды) [20].

В научной литературе и в сети Интернет нами не обнаружено сведений, относящихся к влиянию молибдена на анодное поведение эвтектоидного сплава Zn0.5Al. Исходя из этого в качестве легирующего компонента сплава Zn0.5Al был выбран молибден.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния добавок молибдена на анодное поведение сплава Zn0.5Al и разработке оптимального состава сплавов, которые могут использоваться в качестве эффективных покрытий и протекторов для повышения коррозионной стойкости стальных конструкций, изделий и сооружений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При изучении анодного поведения сплавов давно и продуктивно используются электрохимические методы исследования, особенно потенциодинамические² [22, 23]. Применяя потенциодинамические режимы исследования, можно оценить в поведении анодного сплава роль электродного потенциала в пассивном состоянии. Известно, что важнейшей анодной характе-

¹ Шлугер А.М., Ажогин Ф.Ф., Ефимов Е.А. Коррозия и защита металлов: учеб. пособие для металлургических специальностей вузов. М.: Металлургия. 1981. 216 с.

² Слэндер С.Д., Бойд У.К. Коррозионная стойкость цинка: справочник / пер с англ. Е.В. Проскурина, А.И. Литвиновой. М.: Металлургия. 1976. 200 с.

ристикой процесса является зависимость кинетики растворения защитного покрытия от потенциала, важная для избрания способа защиты и повышения устойчивости анодного сплава в заданных условиях эксплуатации.

Образцы сплава для исследования были получены из цинка марки х.ч. (гранулированный), алюминия марки А7 и его лигатуры с молибденом (2% Мо) сплавлением в тиглях из оксида алюминия в шахтной печи электрического сопротивления типа СШОЛ в интервале температур 650–750 °С. Химический анализ компонентов состава исследуемых сплавов контролировался микрорентгеноспектральным анализом на приборе SEM серии AIS 2100 (Южная Корея). Из полученных сплавов в графитовую изложницу отливали стержни диаметром 8 мм и длиной 140 мм. Боковые части образцов покрывались коррозионностойким лаком. Рабочей поверхностью служил торец электрода.

Потенциодинамическое исследование анодного поведения сплава Zn0.5Al, легированного молибденом, проводили в кислых (0,1 М, pH = 1; 0,01 М, pH = 2; 0,001 М, pH = 3), нейтральных (0,03; 0,3; 3%, pH = 7) и щелочных (0,001 М, pH = 10; 0,01 М, pH = 11; 0,1 М, pH = 12) средах электролитов HCl, NaCl и NaOH. Скорость разветки электродного потенциала на приборе потенциостат ПИ-50.1.1 составляла 2 мВ/с. Электродом сравнения служил хлорсеребряный (х.с.э.), вспомогательным – платиновый. Методика электрохимического исследования сплавов подробно описана в работах² [22, 24–26]. Схематическое изображение последовательности операций при снятии поляризационных кривых образцов исследуемых сплавов, на примере сплава Zn0.5Al, легированного 0,05% масс. молибдена, представлено на рис. 1. При коррозионно-

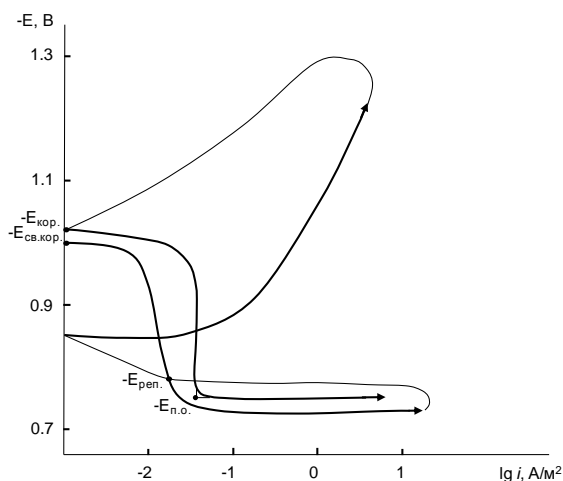


Рис. 1. Потенциодинамические анодные и катодные поляризационные кривые сплава Zn0.5Al, содержащего 0,05% масс. молибдена, в 3%-м электролите NaCl

Fig. 1. Potentiodynamical anodic and cathodic polarization curves of Zn0.5Al alloy containing 0.05% wt. of molybdenum, in 3% NaCl electrolyte

электрохимических исследованиях образцы потенциодинамически поляризовали в положительном направлении от стационарного потенциала свободной коррозии ($-E_{св.корр.}$, В), установившегося при погружении, до резкого возрастания тока в результате питтингообразования ($-E_{п.о.}$, В). Затем образцы поляризовали в обратном направлении, в результате чего происходило подщелачивание приэлектродного слоя поверхности сплава ($-E_{реп.}$, $-E_{корр.}$, В). Наконец, образцы поляризовали в положительном направлении ($-E_{п.о.}$, В) и получали потенциодинамические анодные и катодные поляризационные кривые исследуемых сплавов (см. рис. 1). Далее по кривым определяли коррозионно-электрохимические потенциалы сплава Zn0.5Al, легированного от 0,01 до 1,0% масс. молибдена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Зависимость потенциала свободной коррозии сплавов от времени играет важную роль в установлении пассивности поверхности в различных средах. Результаты исследования по установлению стационарного значения потенциала свободной коррозии сплава Zn0.5Al, легированного молибденом, наблюдали в течение 1 ч. Для всех исследованных групп сплавов, содержащих 0,01–1,0% масс. молибдена (на примере указанной среды), в первые 15 мин наблюдения отмечено незначительное смещение потенциала в область положительных значений, что объясняется процессом формирования защитной оксидной пленки, который заканчивается через 30–40 мин от начала (табл. 1, рис. 2).

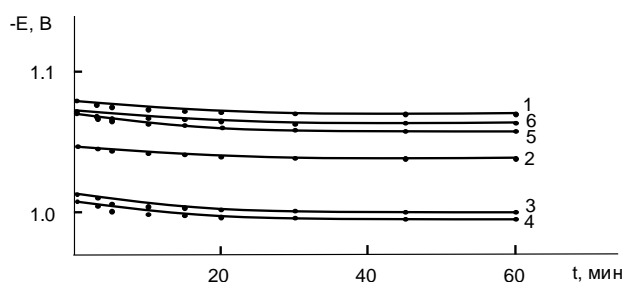


Рис. 2. Изменение потенциала свободной коррозии во времени сплава Zn0.5Al (1), содержащего молибдена, % масс.: 0,01 (2); 0,05 (3); 0,1 (4); 0,5 (5); 1,0 (6), в среде 3%-го NaCl

Fig. 2. Time change of free corrosion potential of Zn0.5Al (1) alloy, containing molybdenum, % wt.: 0.01 (2); 0.05 (3); 0.1 (4); 0.5 (5); 1.0 (6) in 3% NaCl

В табл. 2 представлены потенциалы коррозии ($-E_{корр.}$, В), питтингообразования ($-E_{п.о.}$, В) и репассивации ($-E_{реп.}$, В) сплава Zn0.5Al, легированного молибденом, в кислых, нейтральных и щелочных средах. Видно, что добавки молибдена в пределах изученного диапазона способствуют смещению коррозионно-электрохимичес-

ких потенциалов эвтектидного сплава Zn0.5Al в область отрицательных значений. В результате снижается плотность тока коррозии и скорость коррозии исходного цинк-алюминиевого сплава Zn0.5Al в 1,0–2,5 раза (рис. 3).

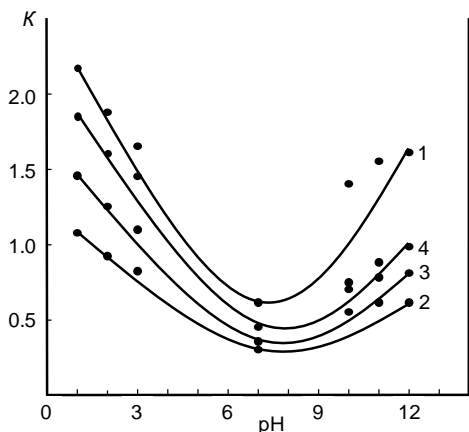


Рис. 3. Зависимость скорости коррозии $K \cdot 10^{-3}$ ($\text{г/м}^2 \cdot \text{ч}$) сплава Zn0.5Al (1), содержащего 0,01 (2), 0,1 (3) и 1,0% масс. (4) молибдена от pH среды

Fig. 3. Corrosion rate $K \cdot 10^{-3}$ ($\text{g/m}^2 \cdot \text{h}$) of the Zn0.5Al (1) alloy containing (2) 0.01, (3) 0.1, and 1.0 wt%. (4) of molybdenum versus pH

Введение 0,5 и 1,0% масс. легирующего компонента в исходный сплав Zn0.5Al заметно сдвигает электрохимические потенциалы репассивации, питтингообразования и коррозии исходного сплава в отрицательном направлении. При этом скорость коррозии сплавов несколько растет, но по абсолютной величине последнее (добавка 1.0% масс. Mo) не превышает скорости коррозии исходного сплава. Следовательно, добавки молибдена в пределах 0,01–0,1% масс. снижают скорость коррозии сплава Zn0.5Al в 2,0–2,5 раза. Более того, указанные составы сплавов наиболее устойчивы к питтинговой коррозии, особенно в кислой (0,001 M HCl), нейтральной (0,03; 0,3; 3% NaCl) и щелочной (0,001 M NaOH) средах (см. табл. 2, рис. 3).

Изменение скорости коррозии сплава Zn0.5Al, легированного молибденом, можно наблюдать в кислых, нейтральных и щелочных средах электролитов HCl, NaCl и NaOH при различных значениях pH среды. Добавки молибдена в пределах 0,01–0,1% масс. снижают скорость коррозии сплава Zn0.5Al в 2,0–2,5 раза. Повышение содержания легирующего компонента до 1,0% масс. ее несколько увеличивает как в кислой среде, так и в щелочной. Наименьшие значения скорости коррозии исходного сплава Zn0.5Al с молибденом зафиксированы в интервале pH = 5–9 (см. рис. 3).

Таблица 1. Изменение стационарного потенциала свободной коррозии ($-E_{\text{св. кор.}}$, В) сплава Zn0.5Al с молибденом во времени в кислой и щелочной средах

Table 1. Time changes in the free corrosion stationary potential ($-E_{\text{sv. corr.}}$, V) of Zn0.5Al alloy with molybdenum in acidic and alkaline ambience

| Среда | Добавки Мо в сплаве, % масс. | Время выдержки образцов, мин | | | | | | | |
|-------------|------------------------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1/3 | 2/3 | 1 | 5 | 15 | 40 | 50 | 60 |
| 0,01 M HCl | – | 1,123 | 1,122 | 1,117 | 1,115 | 1,111 | 1,110 | 1,110 | 1,110 |
| | 0,01 | 1,146 | 1,144 | 1,141 | 1,136 | 1,125 | 1,124 | 1,124 | 1,124 |
| | 0,05 | 1,155 | 1,154 | 1,152 | 1,147 | 1,134 | 1,133 | 1,133 | 1,133 |
| | 0,1 | 1,168 | 1,167 | 1,165 | 1,155 | 1,148 | 1,147 | 1,147 | 1,147 |
| | 0,5 | 1,191 | 1,191 | 1,189 | 1,173 | 1,166 | 1,165 | 1,165 | 1,165 |
| | 1,0 | 1,203 | 1,200 | 1,197 | 1,186 | 1,175 | 1,174 | 1,174 | 1,174 |
| 0,01 M NaOH | – | 1,056 | 1,055 | 1,050 | 1,050 | 1,049 | 1,048 | 1,048 | 1,048 |
| | 0,01 | 1,066 | 1,066 | 1,065 | 1,062 | 1,060 | 1,060 | 1,060 | 1,060 |
| | 0,05 | 1,092 | 1,091 | 1,089 | 1,089 | 1,086 | 1,085 | 1,085 | 1,085 |
| | 0,1 | 1,114 | 1,112 | 1,110 | 1,105 | 1,101 | 1,099 | 1,099 | 1,099 |
| | 0,5 | 1,149 | 1,146 | 1,143 | 1,139 | 1,131 | 1,126 | 1,126 | 1,126 |
| | 1,0 | 1,182 | 1,179 | 1,174 | 1,168 | 1,160 | 1,157 | 1,157 | 1,157 |

Таблица 2. Анодные характеристики (х.с.э.) сплава Zn0.5Al, легированного молибденом, в кислых, нейтральных и щелочных средах

Table 2. Anodic characteristics (ch.s.e.) of the molybdenum doped alloy Zn0.5Al in acidic, neutral and alkaline ambiances

| Среда | Содержание Мо в сплаве, % масс. | Электрохимические потенциалы, В (х.с.э.) | | | | Скорость коррозии | |
|------------|---------------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--|---|
| | | $-E_{\text{св. кор.}}$ | $-E_{\text{кор.}}$ | $-E_{\text{п.о.}}$ | $-E_{\text{рел.}}$ | $i_{\text{кор.}} \cdot 10^{-2}$, A/м^2 | $K \cdot 10^{-3}$, $\text{г/м}^2 \cdot \text{ч}$ |
| 0,001M HCl | – | 1,045 | 1,051 | 0,912 | 0,921 | 0,136 | 1,65 |
| | 0,01 | 1,057 | 1,060 | 0,928 | 0,933 | 0,068 | 0,83 |
| | 0,05 | 1,064 | 1,065 | 0,935 | 0,942 | 0,074 | 0,90 |
| | 0,1 | 1,079 | 1,083 | 0,952 | 0,965 | 0,090 | 1,10 |
| | 0,5 | 1,093 | 1,096 | 0,968 | 0,973 | 0,105 | 1,28 |
| | 1,0 | 1,108 | 1,114 | 0,975 | 0,988 | 0,118 | 1,44 |

Продолжение таблицы 2

| | | | | | | | |
|-----------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 0,03% NaCl | – | 0,960 | 0,968 | 0,745 | 0,759 | 0,037 | 0,45 |
| | 0,01 | 0,922 | 0,937 | 0,738 | 0,755 | 0,019 | 0,23 |
| | 0,05 | 0,910 | 0,926 | 0,715 | 0,722 | 0,018 | 0,22 |
| | 0,1 | 0,900 | 0,905 | 0,700 | 0,705 | 0,023 | 0,28 |
| | 0,5 | 0,953 | 0,961 | 0,740 | 0,752 | 0,029 | 0,35 |
| | 1,0 | 0,957 | 0,958 | 0,742 | 0,762 | 0,031 | 0,37 |
| 0,001 M NaOH | – | 1,025 | 1,033 | 0,845 | 0,853 | 0,116 | 1,41 |
| | 0,01 | 1,034 | 1,045 | 0,863 | 0,880 | 0,045 | 0,55 |
| | 0,05 | 1,052 | 1,066 | 0,887 | 0,899 | 0,057 | 0,69 |
| | 0,1 | 1,077 | 1,082 | 0,902 | 0,907 | 0,058 | 0,71 |
| | 0,5 | 1,106 | 1,117 | 0,934 | 0,947 | 0,060 | 0,73 |
| | 1,0 | 1,129 | 1,140 | 0,955 | 0,970 | 0,061 | 0,74 |
| 0,1 M HCl | – | 1,190 | 1,195 | 1,030 | 1,036 | 0,178 | 2,17 |
| | 0,01 | 1,204 | 1,210 | 1,040 | 1,045 | 0,089 | 1,09 |
| | 0,05 | 1,211 | 1,215 | 1,045 | 1,057 | 0,096 | 1,17 |
| | 0,1 | 1,215 | 1,215 | 1,053 | 1,064 | 0,120 | 1,46 |
| | 0,5 | 1,237 | 1,240 | 1,068 | 1,078 | 0,137 | 1,67 |
| | 1,0 | 1,244 | 1,248 | 1,075 | 1,082 | 0,151 | 1,84 |
| 3,0% | – | 1,070 | 1,086 | 0,779 | 0,794 | 0,055 | 0,67 |
| | 0,01 | 1,039 | 1,048 | 0,764 | 0,785 | 0,028 | 0,34 |
| | 0,05 | 1,000 | 1,020 | 0,750 | 0,780 | 0,027 | 0,33 |
| | 0,1 | 0,991 | 0,996 | 0,718 | 0,723 | 0,032 | 0,39 |
| | 0,5 | 1,058 | 1,064 | 0,805 | 0,811 | 0,039 | 0,47 |
| | 1,0 | 1,063 | 1,075 | 0,820 | 0,827 | 0,041 | 0,50 |
| 0,1 M NaOH | – | 1,210 | 1,216 | 0,920 | 0,936 | 0,133 | 1,62 |
| | 0,01 | 1,215 | 1,218 | 0,930 | 0,934 | 0,052 | 0,63 |
| | 0,05 | 1,219 | 1,220 | 0,967 | 0,980 | 0,055 | 0,67 |
| | 0,1 | 1,238 | 1,244 | 0,989 | 0,995 | 0,068 | 0,83 |
| | 0,5 | 1,269 | 1,272 | 1,000 | 1,011 | 0,075 | 0,91 |
| | 1,0 | 1,276 | 1,280 | 1,110 | 1,128 | 0,080 | 0,97 |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, легирование используемого для защиты от коррозии сплава Zn0.5Al молибденом придает защитному покрытию большую анодную устойчивость в кислой, нейтральной и щелочной средах. Эффективное торможение той или иной стадии процесса коррозии и разрушения поверхности связано с особенностями протекания анодного процесса (например, торможения анодного процесса из-за наступления пассивного состояния). Плотность тока и скорость коррозии эвтектидного сплава Zn0.5Al уменьшается в 2,0–2,5 раза при введении в него не

более 0,1% масс. молибдена. Увеличение содержания легирующего элемента способствует исчезновению достигнутого эффекта и приближению свойств легированного сплава к свойствам образца (исходного сплава). Отмеченный эффект оказывается наиболее значим в среде, близкой к нейтральной.

Более того, найденные в результате опытов некоторые оптимальные условия (по содержанию легирующего компонента и кислотности среды) важны для разработки анодных покрытий и протекторов для защиты от коррозии конструкций и изделий из стали и чугуна.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виткин А.И., Тейндл И.И. Металлические покрытия листовой и полосовой стали. М.: Металлургия. 1971. 493 с.
2. Кечин В.А., Люблинский Е.Я. Цинковые сплавы. М.: Металлургия. 1986. 247 с.
3. Mazilkin A.A., Straumal B.B., Borodachenkova M.V., Valiev R.Z., Kogtenkova O.A., Baretzky B. Gradual softening of Al-Zn alloys during high-pressure torsion // *Materials Letters*. 2012. Vol. 84. P. 63–65. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.06.026>
4. Obidov Z.R. Thermophysical properties and thermodynamic functions of the beryllium, magnesium and praseodymium alloyed Zn-55Al alloy // *High Temperature*. 2017. Vol. 55. Issue 1. P. 150–153. <https://doi.org/10.7868/S0040364417010161>
5. Яковлева А.А., Анциферов Е.А., Гусе-

ва Е.А., Садловский С.В. Влияние защитного покрытия на основе органического связующего на коррозионную устойчивость стали // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019. Т. 9. N 4. С. 600–611. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-600-611>

6. Valiev R.Z., Murashkin M.Yu., Kilmametov A., Straumal B., Chinh N.Q., Langdon T.G. Unusual super-ductility at room temperature in an ultrafine-grained aluminum alloy // *Journal of Materials Science*. 2010. Vol. 45. Issue 17. P. 4718–4724. <https://doi.org/10.1007/s10853-010-4588-z>

7. Najafabadimini R.A., Irani M., Ganiev I., Obidov Z. Galfan I and Galfan II doped with calcium, corrosion resistant alloys // *Oriental Journal of Chemistry*. 2014. Vol. 30. Issue 3. P. 969–973. <https://doi.org/>

org/10.13005/ojc/300307

8. Tokuteru U., Yorinobu T., Kawasaki M., Higashi K. Achieving room-temperature superplasticity in an ultrafin-grained Zn-22% Al alloy // *Letters on Materials*. 2015. Vol. 5. Issue 3 (19). P. 269–275. <https://doi.org/10.22226/2410-3535-2015-3-269-275>

9. Обидов З.Р. Анодное поведение и окисление сплавов Zn5Al и Zn55Al, легированных барием // *Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)*. 2015. N 31 (57). С. 51–54.

10. Amini R., Obidov Z., Ganiev I., Razazi M. Potentiodynamical research of Zn-Al-Mg alloy system in the neutral ambience of NaCl electrolyte and influence of Mg on the structure // *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology*. 2012. Vol. 2. Issue 2. P. 110–114. <https://doi.org/10.4236/jsemat.2012.22017>

11. Gurjar M.S., Dehiya S., Sharma M., Upadhyay N.C. Effect of fly ash particles on the mechanical properties of Zn–22% Al alloy via stir casting method // *IOSR Journal of Mechanical and Civil Engineering*. 2013. Vol. 10. Issue 2. P. 39–42.

12. Obidov Z.R. Effect of pH on the anodic behavior of beryllium and magnesium doped alloy Zn55Al // *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2015. Vol. 88. Issue 9. P. 1451–1457. <https://doi.org/10.1134/S1070427215090116>

13. Amini R., Obidov Z., Ganiev I., Razazi M. Anodic behavior of Zn-Al-Be alloys in the NaCl solution and the influence of Be on structure // *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology*. 2012. Vol. 2. Issue 2. P. 127–131. <https://doi.org/10.4236/jsemat.2012.22020>

14. Обидов З.Р. Влияние pH среды на анодное поведение сплава Zn5Al, легированного бериллием и магнием // *Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)*. 2015. N 32 (58). С. 43–46.

15. Obidov Z.R., Amonova A.V., Ganiev I.N. Influence of the pH of the medium on the anodic behavior of scandium – doped Zn55Al alloy // *Russian Journal of Non-Ferrous Metals*. 2013. Vol. 54. Issue 3. P. 234–238. <https://doi.org/10.3103/S1067821213030115>

16. Lin K.L., Yang C.F., Lee J.T. Correlation of microstructure with corrosion and electrochemical behaviours of the bach-type hot-dip Al-Zn coatings: Part 1. Zn and 5% Al-Zn coatings // *Corrosion*. 1991. Vol. 47. Issue 1. P. 9–17. <https://doi.org/10.5006/1.3585224>

17. Obidov Z.R., Amonova A.V., Ganiev I.N. Effect of scandium doping on the oxidation resistance of Zn5Al and Zn55Al alloys // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2013. Vol. 87. Issue 4. P. 702–703. <https://doi.org/10.1134/S0036024413040201>

18. Lin K.L., Yang C.F., Lee J.T. Correlation of microstructure with corrosion and electrochemical behaviours of the bach-type hot-dip Al-Zn coatings: Part 2. 55% Al-Zn coatings // *Corrosion*. 1991. Vol. 47. Issue 1. P. 17–23. <https://doi.org/10.5006/1.3585213>

19. Obidov Z.R. Anodic behavior and oxidation of strontium-doped Zn5Al and Zn55Al alloys // *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2012. Vol. 48. Issue 3. P. 352–355. <https://doi.org/10.1134/S2070205112030136>

20. Герасименко А.А. Об особенностях получения и преимуществах использования электрохимических покрытий сплавами цинка с оловом и молибденом // *Технологии в электронной промышленности*. 2010. N 7. С. 33–39.

21. Атрашкова В.В., Атрашков В.К., Герасименко А.А. Осаждение цинк-молибденовых покрытий // *Защита металлов*. 1995. Т. 31. N 3. С. 67–71.

22. Фрейман Л.И., Макаров В.А., Брыксин И.Е. Потенциостатические методы в коррозионных исследованиях и электрохимической защите. Л.: Химия. 1972. 240 с.

23. Постников Н.С. Коррозионностойкие алюминиевые сплавы. М.: Metallurgy. 1976. 301 с.

24. Колотыркин Я.М. Металл и коррозия. М.: Metallurgy. 1985. 88 с.

25. Семенова И.В., Флорианович Г.М., Хорошилов А.В. Коррозия и защита от коррозии. М.: Физматлит. 2002. 336 с.

26. Улиг Г.Г., Ревин Р.У. Коррозия и борьба с ней. Введение в коррозионную науку и технику / пер. с англ. А.М. Сухотина, А.И. Хентова; под ред. А.М. Сухотина. Л.: Химия. 1989. 456 с.

REFERENCES

1. Vitkin AI, Teindl II. *Metal coverings of a sheet and strip steel*. Moscow: Metallurgiya; 1971. 493 p. (In Russian)

2. Kechin VA, Lyblinskiy EYa. *Zinc alloys*. Moscow: Metallurgiya; 1986. 247 p. (In Russian)

3. Mazilkin AA, Straumal BB, Borodachenkova MV, Valiev RZ, Kogtenkova OA, Baretzky B. Gradual softening of Al-Zn alloys during high-pressure torsion. *Materials Letters*. 2012;84:63–65. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.06.026>

4. Obidov ZR. Thermophysical properties and thermodynamic functions of the beryllium, magnesium and praseodymium alloyed Zn-55Al alloy. *High*

Temperature. 2017;55(1):150–153. <https://doi.org/10.7868/S0040364417010161>

5. Yakovleva AA, Antsiferov EA, Guseva EA, Sadlovsky SV. Effect of an organic binder protective coating on the corrosion resistance of steel. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(4):600–611. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-600-611>

6. Valiev RZ, Murashkin MYu, Kilmametov A, Straumal B, Chinh NQ, Langdon TG. Unusual superductility at room temperature in an ultrafine-grained aluminum alloy. *Journal of Materials Science*.

2010;45(17):4718–4724. <https://doi.org/10.1007/s10853-010-4588-z>

7. Najafabadimini RA, Irani M, Ganiev I, Obidov Z. Galfan I and Galfan II doped with calcium, corrosion resistant alloys. *Oriental Journal of Chemistry*. 2014;30(3):969–973. <https://doi.org/10.13005/ojc/300307>

8. Tokuteru U, Yorinobu T, Kawasaki M, Higashi K. Achieving room-temperature superplasticity in an ultrafine-grained Zn-22% Al alloy. *Letters on Materials*. 2015;5(3):269–275. <https://doi.org/10.22226/2410-3535-2015-3-269-275>

9. Obidov Z. Anodic behavior and oxidation of the Zn5Al and Zn55Al alloy, doped with barium. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo instituta (tekhnicheskogo universiteta) = Bulletin of the Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University)*. 2015;31:51–54. (In Russian)

10. Amini R, Obidov Z, Ganiev I, Razazi M. Potentiodynamical research of Zn-Al-Mg alloy system in the neutral ambience of NaCl electrolyte and influence of Mg on the structure. *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology*. 2012;2(2):110–114. <https://doi.org/10.4236/jseamat.2012.22017>

11. Gurjar MS, Dehiya S, Sharma M, Upadhyay NC. Effect of fly ash particles on the mechanical properties of Zn–22% Al alloy via stir casting method. *IOSR Journal of Mechanical and Civil Engineering*. 2013;10(2):39–42.

12. Obidov ZR. Effect of pH on the anodic behavior of beryllium and magnesium doped alloy Zn55Al. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2015;88(9):1451–1457. <https://doi.org/10.1134/S1070427215090116>

13. Amini R, Obidov Z, Ganiev I, Razazi M. Anodic behavior of Zn-Al-Be alloys in the NaCl solution and the influence of Be on structure. *Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology*. 2012;2(2):127–131. <https://doi.org/10.4236/jseamat.2012.22020>

14. Obidov ZR. Influence of pH of a medium on anodic behavior of Zn5Al alloy doped with beryllium and magnesium. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo instituta (tekhnicheskogo universiteta) = Bulletin of the Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University)*. 2015;32:43–46. (In Russian)

15. Obidov ZR, Amonova AV, Ganiev IN. Influ-

ence of the pH of the medium on the anodic behavior of scandium – doped Zn55Al alloy. *Russian Journal of Non-Ferrous Metals*. 2013;54(3):234–238. <https://doi.org/10.3103/S1067821213030115>

16. Lin KL, Yang CF, Lee JT. Correlation of microstructure with corrosion and electrochemical behaviours of the batch-type hot-dip Al-Zn coatings: Part 1. Zn and 5% Al-Zn coatings. *Corrosion*. 1991;47(1):9–17. <https://doi.org/10.5006/1.3585224>

17. Obidov ZR, Amonova AV, Ganiev IN. Effect of scandium doping on the oxidation resistance of Zn5Al and Zn55Al alloys. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2013;87(4):702–703. <https://doi.org/10.1134/S0036024413040201>

18. Lin KL, Yang CF, Lee JT. Correlation of microstructure with corrosion and electrochemical behaviors of the batch-type hot-dip Al-Zn coatings: Part 2. 55% Al-Zn coatings. *Corrosion*. 1991;47(1):17–23. <https://doi.org/10.5006/1.3585213>

19. Obidov ZR. Anodic behavior and oxidation of strontium-doped Zn5Al and Zn55Al alloys. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2012;48(3):352–355. <https://doi.org/10.1134/S2070205112030136>

20. Gerasimenko AA. About features of reception and use advantages of electrochemical coverings of zinc alloys with tin and molybdenum. *Tekhnologii v elektronnoi promishlennosti*. 2010;7:33–39. (In Russian)

21. Atrashkova VV, Atrashkov VK, Gerasimenko AA. Electrodeposition of zinc-molybdenum coatings. *Zashchita metallov*. 1995;31(3):313–314. (In Russian)

22. Freiman LI, Makarov VA, Bryksin IE. *Potentiostatical methods in corrosion researches and electrochemical protection*. Leningrad: Khimiya; 1972. 240 p. (In Russian)

23. Postnikov NS. *Corrosion-resistant aluminum alloys*. Moscow: Metallurgiya; 1976. 301 p. (In Russian)

24. Kolotyarkin YaM. *Metal and corrosion*. Moscow: Metallurgiya; 1985. 88 p. (In Russian)

25. Semenova IV, Florianovich GM, Khoroshilov AV. *Corrosion and corrosion protection*. Moscow: Fizmatlit; 2002. 336 p. (In Russian)

26. Uhlig HH, Revie RW. *Corrosion and corrosion control. An Introduction to Corrosion Science and Engineering*. 3-rd Edition. New York: John Wiley & Sons. 1985. (Russ. ed.: Ulig GG, Revi RU. *Korroziya i bor'ba s nei. Vvedenie v korroziionnuyu nauku i tekhniku*. Leningrad: Khimiya; 1989. 456 p.)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Обидов Зиёдулло Рахматович,
д.х.н., доцент, главный научный сотрудник,
Институт химии им. В.И. Никитина
АН Республики Таджикистан,
734063, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2,
Республика Таджикистан,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ziyodullo R. Obidov,
Dr. Sci. (Chemistry), Assistant Professor,
Chief Researcher,
V.I. Nikitin Institute of Chemistry,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Ayni St., Dushanbe, 734063,

✉ e-mail: z.r.obidov@rambler.ru

Republic of Tajikistan,
✉ e-mail: z.r.obidov@rambler.ru

Иброхимов Пайрав Рустамович,
соискатель,
Институт химии им. В.И. Никитина
АН Республики Таджикистан,
734063, г. Душанбе, ул. Айна, 299/2,
Республика Таджикистан

Pairav R. Ibrohimov,
Applicant,
V.I. Nikitin Institute of Chemistry,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Ayni St., Dushanbe, 734063,
Republic of Tajikistan

Рахимов Фируз Акбарович,
старший научный сотрудник,
Институт химии им. В.И. Никитина
АН Республики Таджикистан,
734063, г. Душанбе, ул. Айна, 299/2,
Республика Таджикистан

Firuz A. Rahimov,
Senior Scientific,
V.I. Nikitin Institute of Chemistry,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Ayni St., Dushanbe, 734063,
Republic of Tajikistan

Ганиев Изатулло Наврузович,
д.х.н., профессор, академик АН Республики
Таджикистан, заведующий лабораторией
коррозионноустойчивых материалов,
Институт химии им. В.И. Никитина
АН Республики Таджикистан,
734063, г. Душанбе, ул. Айна, 299/2,
Республика Таджикистан

Izatullo N. Ganiev,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Academician of Academy of Sciences
of the Republic of Tajikistan,
Head of the Laboratory
of Corrosion-resistant Materials,
V.I. Nikitin Institute of Chemistry,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Ayni St., Dushanbe, 734063,
Republic of Tajikistan

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

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

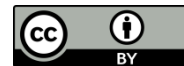
*Поступила в редакцию 20.04.2021.
Одобрена после рецензирования 20.05.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.*

*The article was submitted 20.04.2021.
Approved after reviewing 20.05.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 547.024

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-195-204>



Радикальные превращения органических растворителей в суб- и сверхкритических условиях

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

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

Резюме: Выполнено сравнительное исследование химических превращений этанола, ацетона и диметилкарбоната в интервале температур 200–300 °С. Эти соединения широко используются в качестве растворителей при обработке растительного сырья. Поэтому знание их поведения в реакционной среде актуально для понимания механизма процессов суб- и сверхкритической экстракции растительного сырья и роли растворителей в этих процессах. Установлено, что исследуемые соединения в определенных условиях выступают как источники свободных радикалов и тем самым могут способствовать радикальному разложению основных компонентов растительной биомассы. Для обнаружения в реакционной среде свободных радикалов использован толуольный метод Шварца. Показано, что радикальный распад связей в молекулах ацетона и диметилкарбоната происходит уже при температуре 200 °С, а в молекулах этанола – только в сверхкритических условиях при температурах выше 250 °С. Основным процессом при термообработке смесей толуола и растворителей являются реакции алкилирования с образованием различных алкилбензолов с преобладающим выходом для всех исследованных растворителей ксилолов. В интервале температур 200–250 °С наибольшая алкилирующая способность характерна для ацетона, наименьшая – для этанола. При температурах более 250 °С алкилирующая способность растворителей примерно одинаковая при незначительном преобладании для диметилкарбоната. Ацетон, в отличие от других растворителей, в условиях процесса наряду с радикальными превращениями участвует в реакциях нуклеофильного присоединения. Доля продуктов, полученных в результате этих реакций при температурах выше 250 °С, является преобладающей. Основными из них являются продукты альдольной и кротоновой конденсации ацетона. На основании результатов исследования предложены схемы радикального распада молекул растворителей и формирования продуктов термообработки.

Ключевые слова: свободные радикалы, органические растворители, суб- и сверхкритические условия, алкилирование, радикальные превращения, толуольный метод

Для цитирования: Евстафьев С.Н., Фомина Е.С., Тигунцева Н.П., Шашкина С.С. Радикальные превращения органических растворителей в суб- и сверхкритических условиях. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 2. С. 195–204. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-195-204>

Radical transformations of organic solvents under sub- and supercritical conditions

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

Irkutsk National Research Technical University,
Irkutsk, Russian Federation

Abstract: A comparative study of chemical transformations of ethanol, acetone and dimethyl carbonate was performed in a temperature range from 200 to 300 °C. These compounds are widely used as solvents for processing vegetable raw materials. Therefore, knowing their behaviour in a reaction medium is necessary to understand the mechanism of sub- and supercritical extraction of the vegetable raw materials and the role of solvents in this process. It was established that the investigated compounds under certain conditions function as a source of free radicals; thus, they can contribute to the radical decomposition of the major components in plant biomass. The Schwarz toluene method was used to detect free radicals in reaction media. It is shown that radical breakdown of bonds in the acetone and dimethyl carbonate molecules occurs

already at a temperature of 200 °C, and in ethanol – only under supercritical conditions at temperatures over 250 °C. Alkylation is the main reaction occurring during the thermal treatment of toluene and solvents mixtures, which leads to a high yield of various alkylbenzenes for all investigated xylene solvents. In a temperature range from 200 to 250 °C, acetone has the highest alkylating capability and ethanol – the lowest one. At temperatures above 250 °C, the alkylating capability of solvents is similar, with a slight prevalence of that of dimethyl carbonate. Unlike other solvents, acetone participates in nucleophilic addition reactions along with radical transformations under process conditions. The products obtained as a result of these reactions at temperatures above 250 °C are predominant. The main ones are the products of the aldol and crotonic condensation of acetone. Based on the results of a study, the pathways of the radical decomposition of solvents molecules and the formation of products of thermal treatment were proposed.

Keywords: free radicals, organic solvents, sub- and supercritical conditions, alkylation, radical transformations, toluene method

For citation: Evstaf'ev SN, Fomina ES, Tiguntceva NP, Shashkina SS. Radical transformations of organic solvents under sub- and supercritical conditions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):195–204. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-195-204>

ВВЕДЕНИЕ

Развитие промышленного производства сопровождается серьезными экологическими проблемами и приводит к нехватке энергии, в том числе жидкого топлива, в связи с чем разработка экономически и экологически целесообразного процесса производства топлива из альтернативного сырья имеет большое значение¹ [1, 2]. В качестве сырья определен интерес представляет биомасса, являющаяся многотоннажным возобновляемым органическим ресурсом.

Одним из наиболее перспективных методов переработки биомассы в жидкое топливо является ее сжигание в суб- и сверхкритических условиях с использованием неорганических [3–7] и органических растворителей. В качестве последних применяют спирты [8–10], кетоны [11, 12], сложные эфиры [13] и др. Преобразование биомассы в жидкое топливо в суб- и сверхкритических условиях представляет собой сложный комплекс термохимических превращений органических соединений [14, 15]. Уточнение механизмов этих превращений должно привести к лучшему пониманию процесса преобразования.

Применительно к этанолизу предложенные на сегодняшний день механизмы превращения компонентов биомассы лигноцеллюлозы предполагают в условиях процесса, независимо от температурного диапазона, наличие кислой среды, обеспечивающей гидролиз полисахаридов и лигнина с образованием низкомолекулярных продуктов. Практически не рассматривается возможность протекания в условиях процесса радикальных превращений компонентов лигноцеллюлозы и растворителя, хотя известно, что при пиролизе древесины гомолитический разрыв гликозидных связей в полисахаридах наблюда-

ется уже при температуре 200 °C² [16]. С высокой интенсивностью эти процессы протекают в интервале 275–290 °C, т.е. применительно к этанолизу – в сверхкритических условиях. В этих условиях инициатором радикальных превращений может быть этанол. Об образовании радикалов водорода и гидроксила из суб- и сверхкритического этанола упоминается в работе [17], но при этом экспериментально гомолиз связей подтвержден только для сверхкритических условий.

Термическое разложение ацетона изучено более детально, чем этанола. Оно, как и фотохимическое разложение, является классическим примером реакций с участием свободных радикалов. Гомолиз связей в молекуле ацетона при термообработке в газовой фазе сопровождается образованием радикалов водорода, ацетила и метила. Однако механизм термических превращений в газовой фазе может отличаться от превращений во флюидной среде. Применительно к условиям суб- и сверхкритической обработки лигноцеллюлозного сырья ни механизм процесса, ни состав продуктов, образующихся с участием ацетона, детально не исследованы.

Отличительной особенностью диметилкарбоната является высокая метилирующая способность с минимальным образованием побочных токсичных продуктов, что и объясняет его использование в качестве алкилирующего реагента [18]. Процесс электрофильного С- и О-алкилирования проводят в щелочной среде при относительно низких температурах – до 200 °C. Как растворитель для процесса термохимической обработки растительной биомассы диметилкарбонат малоизвестен. Ряд работ, например, [13, 19], посвящен изучению возможности его применения в качестве алкилирующего

¹Ramsurn H., Gupta R.B. Transformation of biomass (pyrolysis, gasification, combustion) // Handbook of Combustion: Online. Part 3. Gaseous and Liquid Fuels. 2016. P. 1–24. <https://doi.org/10.1002/9783527628148.hoc102>

²Азаров В.И., Буров А.В., Оболенская А.В. Химия древесины и синтетических полимеров: учебник для вузов. СПб.: Изд-во СПбЛТА, 1999. 628 с.

агента при изучении строения лигнина и химических превращений биомассы соломы пшеницы. Вместе с тем механизм превращений диметилкарбоната в условиях обработки и влияния полученных продуктов на лигноцеллюлозное сырье в процессе обработки недостаточно изучен. Предположения об образовании свободных радикалов при гомолизе связей в молекуле диметилкарбоната в сверхкритических условиях высказаны в работе [20]. Информации об исследованиях возможности осуществления данного процесса в субкритических условиях не найдено. Целью настоящей работы являлось сравнительное исследование химических превращений этанола, ацетона и диметилкарбоната в суб- и сверхкритических условиях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперимент выполнен в автоклаве объемом 8 см³, изготовленном из нержавеющей стали. При термообработке смеси толуол:растворитель в автоклав заливали 1 см³ толуола (ч.д.а.) и 7 см³ растворителя. Температура обработки – 200, 230, 250, 280, 300 °С. При термообработке смеси растворитель:йод в автоклав загружали 0,2 г йода и приливали 7 см³ растворителя. Температура обработки – 280 °С.

После загрузки смеси автоклав герметично закрывали, встряхивали и помещали в предварительно нагретую керамическую печь. Скорость нагрева автоклава – 20 °С/мин, охлаждения – 50 °С/мин. Продолжительность обработки – 10 мин.

После охлаждения автоклава состав смеси анализировали на хроматографе 7820 А с селективным масс-спектрометрическим детектором HP 5975 («Agilent Technologies», США) с использованием кварцевой колонки 30000×0,25 мм со стационарной фазой (95% диметил – 5% дифенилполисилоксан).

Условия анализа смеси толуол:растворитель: подъем температуры с 50 до 200 °С – со скоростью 10 °С/мин, выдержка в течение 10 мин при температуре 200 °С.

Условия анализа смеси растворитель:йод: температура – 60 °С, выдержка в течение 10 мин.

Идентификацию соединений осуществляли с использованием библиотеки масс-спектров NIST 11. Относительное содержание идентифицированных соединений вычисляли по площадям пиков без корректирующих коэффициентов чувствительности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение химических превращений органических растворителей в смеси с толуолом выполнено в интервале температур 200–300 °С, т.е. в суб- и сверхкритических условиях исследу-

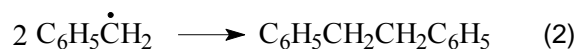
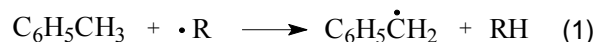
емых растворителей (табл. 1).

Таблица 1. Критические параметры растворителей [21, 22]

Table 1. Critical parameters of the solvents [21, 22]

| Растворитель | Температура, °С | Давление, МПа |
|-----------------|-----------------|---------------|
| Ацетон | 235,0 | 4,80 |
| Диметилкарбонат | 274,9 | 4,63 |
| Этанол | 243,0 | 6,39 |

Задачей исследования являлось подтверждение или опровержение предположения о том, что термохимические процессы с использованием исследуемых растворителей в суб- и сверхкритических условиях имеют радикальный механизм. Для обнаружения в реакционной среде свободных радикалов был использован толуольный метод Шварца, основанный на образовании при взаимодействии толуола со свободными радикалами стабильного бензильного радикала (1), не способного инициировать радикальный разрыв связей³. Для него предпочтительнее реакции рекомбинации с присутствующими в реакционной среде радикалами с образованием различных соединений, в том числе продукта димеризации – дибензила (2):



Присутствие дибензила в составе продуктов термообработки смеси однозначно свидетельствует о наличии в реакционной среде свободных радикалов, источником которых является растворитель.

В результате выполненного исследования установлено, что состав продуктов термообработки смесей толуола и исследуемых растворителей определяется прежде всего природой растворителя и температурой процесса.

При анализе состава продуктов обработки смеси толуола и этанола выявлено, что химические превращения толуола интенсивно протекают при температурах выше 230 °С, т.е. в сверхкритических для этанола условиях (табл. 2).

После обработки смеси в субкритических условиях в интервале 200–230 °С дибензил не обнаружен, а продукты превращения толуола представлены этилбензолом и ксилолами с содержанием близким содержанию в исходном толуоле. С повышением температуры содержание толуола в смеси снижается, а состав продуктов его превращений становится более разнообразным (см. табл. 2).

³Потехин В.М., Потехин В.В. Основы теории химических процессов технологии органических веществ и нефтепереработки: учебник для вузов; 3-е изд., исправл. и доп. СПб.: Лань. 2014. 896 с.

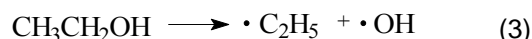
Таблица 2. Состав продуктов термообработки смеси толуола и этанола, % отн. на сумму идентифицированных соединений

Table 2. Composition of heat treatment products of toluene/ethanol mixture, % relative content calculated for the total amount of identified compounds

| Продукты обработки | Температура, °С | | | | |
|--------------------|-----------------|------|------|------|------|
| | 200 | 230 | 250 | 280 | 300 |
| Толуол | 99,2 | 98,1 | 92,0 | 86,5 | 86,7 |
| Этилбензол | 0,1 | – | 0,1 | 0,4 | 0,2 |
| Ксилолы | 0,7 | 1,9 | 6,2 | 8,9 | 8,2 |
| Этилтолуолы | – | – | 0,2 | 0,6 | 1,1 |
| Пропилбензол | – | – | – | 0,4 | 0,5 |
| Триметилбензолы | – | – | 1,5 | 2,2 | 2,4 |
| Крезолы | – | – | – | 0,4 | 0,2 |
| Бензиловый спирт | – | – | – | 0,1 | 0,1 |
| 1-бензилэтанол | – | – | – | 0,2 | 0,2 |
| Дибензил | – | – | – | 0,3 | 0,3 |

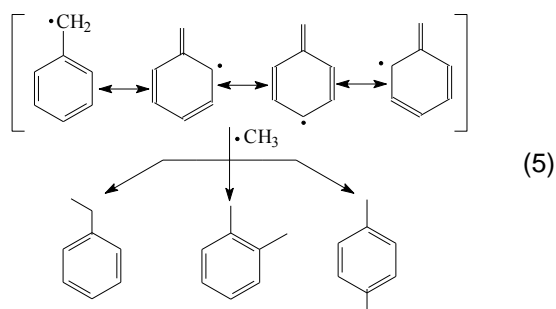
Продукт димеризации бензильного радикала обнаружен после обработки смеси при 280 °С. Поскольку присутствие дибензила является убедительным доказательством гомолиза связей этанола с образованием свободных радикалов, то для объяснения состава полученных продуктов может быть предложен следующий механизм процесса.

Известно, что при термоллизе или облучении светом в молекулах органических соединений происходит гомолиз прежде всего наиболее слабых связей. Применительно к молекуле этанола – это разрыв С–О-связи с образованием радикалов этила и гидроксила (3) и С–С-связи с образованием метильного и гидроксиметильного радикалов (4):



Наличие в реакционной среде алкильных радикалов экспериментально подтверждено при обработке смеси этанола и йода при 280 °С. В составе продуктов обработки методом ГХ-МС обнаружены йодметан и йодэтан.

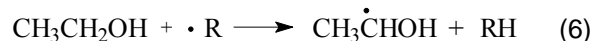
Присутствие изомерных алкилбензолов обусловлено, вероятно, наличием в реакционной среде резонансных структур бензильного радикала, обеспечивающих его стабилизацию с участием π-системы бензольного кольца. При рекомбинации этих структур с метильным радикалом происходит образование *o*- и *p*-ксилолов, этилбензола и триметилбензолов (5) с доминирующим содержанием ксилолов, а с этильным радикалом – *o*- и *p*-этилтолуолов и пропилбензола (см. табл. 2):



Суммарная доля продуктов метилирования составила более 80% от суммы идентифицированных продуктов превращения толуола, в то время как доля продуктов этилирования – менее 15%. Преобладающую долю метилпроизводных толуола можно объяснить сравнительно высокой подвижностью и реакционной способностью метильных радикалов. Это в совокупности с их более высокой концентрацией, в сравнении с бензильными радикалами, обеспечило присутствие продуктов метилирования уже при 250 °С, в то время как продукт димеризации последнего обнаружен при более высоких температурах.

Содержание продуктов рекомбинации гидроксиметильного радикала и резонансных структур бензильного радикала составило менее 5% от суммы идентифицированных соединений. В их составе выявлены бензиловый спирт, *o*- и *p*-крезолы.

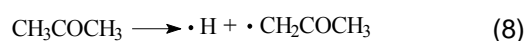
Об образовании радикалов водорода из этанола в суб- и сверхкритических условиях сообщено в работе [17]. Подтвердить это в условиях проведенного нами эксперимента невозможно. Однако косвенным подтверждением выделения их в реакционную среду может быть присутствие в составе продуктов обработки 1-бензилэтанола. Его образование можно объяснить рекомбинацией бензильного радикала и радикала, полученного при гомолизе С–Н-связи, находящейся в α-положении к ОН-группе этанола, или при взаимодействии любого активного радикала с молекулой этанола (6):



В отличие от этанола ацетон, согласно полученным данным, проявляет высокую реакционную способность в субкритических условиях (табл. 3). Как следствие, относительное содержание толуола в термообработанной смеси при 200 °С составило 81,8% отн. При повышении температуры обработки содержание толуола снижается до 56,6% отн. при 300 °С. Как показа-

ли дальнейшие исследования, это происходит в первую очередь в результате интенсивного образования продуктов превращения ацетона. Относительное содержание толуола в смеси, определенное без учета продуктов превращения ацетона, при повышении температуры в интервале 200–300 ° снижается с 87 до 81% отн.

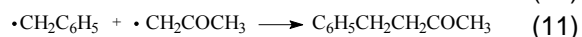
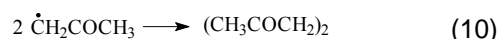
Образование дибензила наблюдается при 230 °С. Полученные результаты можно объяснить, основываясь на известных реакциях с участием свободных радикалов при пиролизе и радиолизе ацетона [23] и предполагая, что все С–С- и С–Н-связи в молекуле ацетона могут разрываться. Тогда начальная стадия гомолиза может включать следующие реакции:



Гомолиз С–С-связей ацетона с образованием метильного и ацетильного радикалов (7) наблюдается уже в субкритических условиях при температуре 200 °С, что подтверждается присутствием в составе продуктов обработки этилбензола, ксилолов и триметилбензолов, чье образование в условиях эксперимента возможно лишь при рекомбинации бензильного и метильного радикалов. При 200 °С эти соединения являются основными продуктами превращения толуола. С повышением температуры обработки состав продуктов становится более разнообразным, но доминирование по содержанию метилпроизводных толуола, и прежде всего ксилолов, сохраняется.

Образующийся при гомолизе С–С-связей ацетильный радикал также может реагировать с окружающими молекулами и свободными радикалами с получением диацетила, ацетальдегида, ацетона, кетена и др. Однако эти соединения в составе продуктов термообработки смеси толуола и ацетона в интервале 200–300 °С не обнаружены. Вероятно, в условиях эксперимента ацетил-радикал полностью диссоциирует на метил-радикал и оксид углерода (II), как показано на схеме (7).

Появление в реакционной среде ацетонильного радикала является следствием разрыва С–Н-связи как при термическом воздействии (8), так и при взаимодействии метильного радикала с молекулой ацетона (9). Последующие превращения ацетонильного радикала включают реакции димеризации с получением 2,5-гександиона (10) и рекомбинации с бензильным радикалом с образованием 4-фенил-2-бутанона (11):



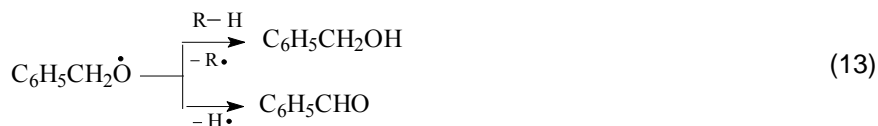
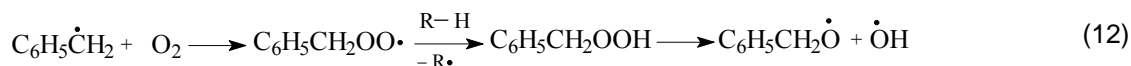
Присутствие в составе продуктов обработки бензальдегида и бензилового спирта можно объяснить процессами окисления бензильного радикала кислородом воздуха. Этого нельзя исключить, поскольку обработка смеси проводилась не в инертной среде. Согласно схеме (12) при разложении образовавшегося при окислении гидропероксида бензила выделяются два радикала, дальнейшие превращения которых приводят к образованию бензилового спирта и бензальдегида (13) и (14):

Таблица 3. Состав продуктов термообработки смеси толуола и ацетона, % отн. на сумму идентифицированных соединений

Table 3. Composition of heat treatment products of toluene/acetone mixture, % relative content calculated for the total amount of identified compounds

| Продукты обработки | Температура, °С | | | | |
|--------------------------------|-----------------|------|------|------|------|
| | 200 | 230 | 250 | 280 | 300 |
| Толуол | 81,8 | 72,4 | 64,1 | 58,4 | 56,6 |
| Толуол* | 87,4 | 84,5 | 82,6 | 82,4 | 81,4 |
| Этилбензол | 0,9 | 1,0 | 0,6 | 0,6 | 0,7 |
| Ксилолы | 9,8 | 9,6 | 7,0 | 7,1 | 6,6 |
| Триметилбензолы | 1,0 | 1,5 | 1,3 | 0,9 | 2,0 |
| Бензальдегид | – | 1,3 | 1,7 | 1,3 | 1,2 |
| Бензиловый спирт | 0,2 | 0,8 | 2,5 | 1,9 | 1,3 |
| Дибензил | – | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,3 |
| 4-фенил-3-бутен-2-он | – | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,6 |
| 4-фенилбутан-2-он | – | – | 0,1 | 0,2 | 0,3 |
| 2,5-гександион | – | – | 0,2 | 0,1 | 0,2 |
| 4-метил-3-пентен-2-он | 5,7 | 4,9 | 7,9 | 15,8 | 20,5 |
| 4-гидрокси-4-метил-2-пентанон | – | 8,0 | 14,0 | 12,7 | 8,8 |
| 2,6-диметил-2,5-гептадиен-4-он | – | 0,3 | 0,3 | 0,6 | 1,0 |

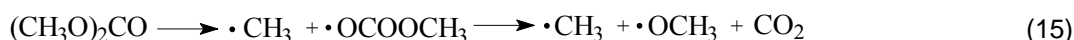
* Расчет содержания выполнен без учета продуктов превращения ацетона.



В исследуемом интервале температур наряду с радикальными превращениями ацетон участвует в реакциях нуклеофильного присоединения. Доля продуктов, полученных в результате этих реакций при 230 °С, соизмерима с долей продуктов превращения толуола, а при 300 °С превышает их содержание в 2,5 раза. Основными среди них являются продукты альдольной и кротоновой конденсации двух молей ацетона – 4-гидрокси-4-метил-2-пентанон и 4-метил-3-пентен-2-он соответственно. В меньших количествах выделены продукты альдольной конденсации с последующей дегидратацией трех молей ацетона – 2,6-диметил-2,5-гептадиен-4-он, а также бензальдегида и ацетона – 4-фенил-3-бутен-2-он. С повышением температуры доля ненасыщенных продуктов повышается.

Результаты исследования состава продуктов обработки смеси толуола и диметилкарбоната свидетельствуют о том, что гомолиз связей в молекуле диметилкарбоната протекает при более низких температурах, чем в молекулах ацетона и этанола. Дибензил в следовых количествах обнаружен уже в составе продуктов обработки смеси при 200 °С, что является следствием наличия в реакционной среде активных свободных радикалов, источником которых является диметилкарбонат (табл. 4).

Механизмы формирования приведенных в табл. 4 продуктов обработки можно представить следующим образом. Гомолиз связей в молекуле диметилкарбоната (15) сопровождается образованием метильного, метоксикарбонильного, метоксильного радикалов и оксида углерода (IV).



Присутствие в реакционной среде метильных радикалов было подтверждено составом продуктов обработки смеси толуол и диметилкарбоната, а также результатами обработки смеси диметилкарбоната и йода при 280 °С.

Согласно данным ГХ-МС, в составе продуктов в преобладающих количествах присутствуют метилпроизводные толуола: *o*- и *p*-ксилолы, триметилбензолы, этилбензол. На их долю приходится около 80% отн. идентифицированных продуктов превращения толуола. По содержа-

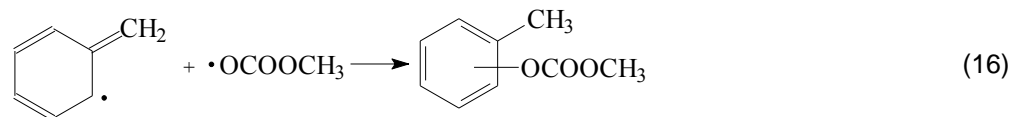
нию, как и в случае ацетона и этанола, доминируют ксилолы.

Превращения метоксикарбонильного радикала, полученного на начальной стадии гомолиза, включают реакции рекомбинации с резонансными структурами бензильного радикала с образованием метилтолилкарбоната (16) и декарбоксилирования с выделением устойчивой молекулы CO₂ и метоксильного радикала (14). Последний при рекомбинации с бензильным радикалом образует метилбензиловый эфир (17):

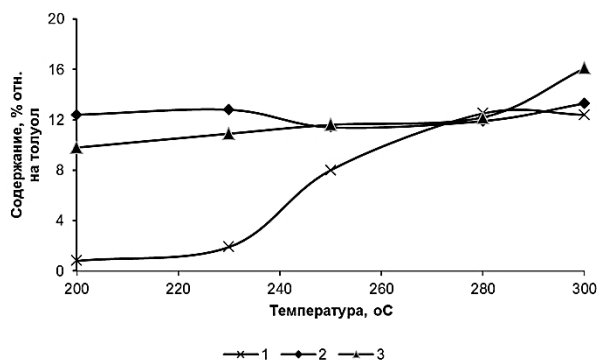
Таблица 4. Состав продуктов термообработки смеси толуола и диметилкарбоната, % отн. на сумму идентифицированных соединений

Table 4. Composition of heat treatment products of toluene/dimethyl carbonate mixture, % relative content calculated for the total amount of identified compounds

| Продукты обработки | Температура, °С | | | | |
|----------------------|-----------------|------|------|------|------|
| | 200 | 230 | 250 | 280 | 300 |
| Толуол | 85,1 | 84,6 | 84,3 | 82,4 | 79,3 |
| Этилбензол | 1,1 | 1,0 | 0,8 | 0,9 | 1,1 |
| Ксилолы | 8,7 | 8,8 | 9,6 | 9,9 | 13,1 |
| Триметилбензолы | 1,0 | 1,1 | 1,2 | 1,4 | 1,9 |
| Бензальдегид | 3,7 | 2,9 | 0,6 | 2,4 | 1,2 |
| Бензиловый спирт | 0,7 | 0,8 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |
| Метилбензиловый эфир | 0,1 | – | 0,1 | 0,2 | 0,2 |
| Метилтолилкарбонат | 0,3 | 0,7 | 1,6 | 2,1 | 2,1 |
| Дибензил | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,3 |



Присутствие в составе продуктов обработки бензальдегида и бензилового спирта обусловлено, вероятно, процессами окисления в условиях эксперимента.



Зависимость выхода продуктов алкилирования толуола от температуры:

1 – смесь с этанолом; 2 – смесь с ацетоном;
 3 – смесь с диметилкарбонатом

Toluene alkylation products yield versus process temperature:

1 – toluene/ethanol; 2 – toluene/acetone;
 3 – toluene/dimethyl carbonate

Таким образом, основным процессом при термообработке смесей толуола и исследуемых растворителей является алкилирование толуола с образованием разнообразных алкилбензолов с преобладающим выходом ксилолов. Согласно

данном рисунку, в интервале температур 200–250 °C наибольшая алкилирующая способность характерна для ацетона, а наименьшая – для этанола. При температурах выше 250 °C алкилирующая способность растворителей примерно одинаковая при незначительном преобладании для диметилкарбоната.

ВЫВОДЫ

На основании проведенного исследования можно заключить:

– что рассмотренные растворители в определенных условиях являются источниками свободных радикалов;

– гомолиз связей в молекулах ацетона и диметилкарбоната происходит в суб- и сверхкритических условиях, а в молекулах этанола – только в сверхкритических условиях при температурах выше 250 °C;

– основным процессом при термообработке смесей толуола и растворителей является метилирование толуола;

– в интервале температур 200–250 °C наибольшая алкилирующая способность характерна для ацетона, наименьшая – для этанола. При температурах более 250 °C она примерно одинаковая для всех растворителей;

– ацетон в условиях процесса наряду с радикальными превращениями участвует в реакциях нуклеофильного присоединения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Balan V., Kumar S., Bals B., Chundawat S., Jin M., Dale B. Biochemical and thermochemical conversion of switchgrass to biofuels. In: Monti A. (ed.). *Switchgrass, green energy and technology*. Springer-Verlag London, 2012. Chapter 7. P. 153–185. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-2903-5_7
- Mohan D., Pittman C.U., Steele P.H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review // *Energy & Fuels*. 2006. Vol. 20. P. 848–889. <https://doi.org/10.1021/ef0502397>
- Timilsena Y.P., Abeywickrama C.J., Rakshit S.K., Brosse N. Effect of different pretreatments on delignification pattern and enzymatic hydrolysability of miscanthus, oil palm biomass and typha grass // *Bioresource Technology*. 2013. Vol. 135. P. 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.010>
- Li H.-Q., Li C.-L., Sang T., Xu J. Pretreatment on *Miscanthus lutarioriparius* by liquid hot water for efficient ethanol production // *Biotechnology for Biofuels*. 2013. Vol. 6. Article number 76. 10 p. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-76>
- Lu J., Li X.-Z., Zhao J., Qu Y. Enzymatic saccharification and ethanol fermentation of reed pretreated with liquid hot water // *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 2012. Vol. 2012. Article ID 276278. 9 p. <https://doi.org/10.1155/2012/276278>
- Evstafev S.N., Chechikova E.V. Transformations of wheat straw polysaccharides in dynamic conditions of subcritical autohydrolysis // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2016. Vol. 42. Issue 7. P. 700–706. <https://doi.org/10.1134/S1068162016070050>
- Han M., Moon S.-K., Kim Y., Chung B., Choi G.-W. Bioethanol production from ammonia percolated wheat straw // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2009. Vol. 14. P. 606–611. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0320-0>
- Bui N.Q., Fongarland P., Rataboul F., Dartiguelongue C., Charon N., Vallee C., et al. Controlled pinewood fractionation with supercritical

ethanol: A prerequisite toward pinewood conversion into chemicals and biofuels // *Comptes Rendus Chimie*. 2018. Vol. 21. Issue 6. P. 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.03.008>

9. Evstaf'ev S.N., Fomina E.S., Privalova E.A. Wheat straw ethanolysis under subcritical and supercritical conditions // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2012. Vol. 38. Issue 7. P. 713–716. <https://doi.org/10.1134/S1068162012070072>

10. Chumpoo J., Prasassarakich P. Bio-oil from hydro-liquefaction of bagasse in supercritical ethanol // *Energy & Fuels*. 2010. Vol. 24. Issue 3. P. 2071–2077. <https://doi.org/10.1021/ef901241e>

11. Li W., Xie X.-A., Sun J., Fan D., Wei X. Investigation of cornstalk cellulose liquefaction in supercritical acetone by FT-TR and GC-MS methods // *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2019. Vol. 12. Issue 3. P. 299–309. <https://doi.org/10.1080/17518253.2019.1643928>

12. Durak H., Aysu T. Thermochemical liquefaction of algae for bio-oil production in supercritical acetone/ethanol/isopropanol // *The Journal of Supercritical Fluids*. 2016. Vol. 111. P. 179–198. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.11.021>

13. Фомина Е.С., Евстафьев С.Н. Сравнительный анализ состава низкомолекулярных продуктов сверхкритической экстракции соломы пшеницы этанолом и диметилкарбонатом // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2018. Т. 8. N 2. С. 9–18. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-2-9-18>

14. Demirbaş A. Mechanisms of liquefaction and pyrolysis reactions of biomass // *Energy Conversion and Management*. 2000. Vol. 41. Issue 6. P. 633–646. [https://doi.org/10.1016/S0196-8904\(99\)00130-2](https://doi.org/10.1016/S0196-8904(99)00130-2)

15. Евстафьев С.Н., Привалова Е.А., Фомина Е.С. Химизм процесса этанолиза соломы пшеницы в суб- и сверхкритических условиях // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2012. N 1. С. 61–68.

16. Фенгел Д., Венер Г. Древесина. Химия, ультраструктура, реакции / пер. с англ. А.В. Оболенской, З.П. Ельницкой; под ред. А.А. Леоновича. М.: Лесная промышленность, 1988. 512 с.

17. Li W., Xie X.-A., Tang C.-Z., Li Y., Li L., Wang Y.-L., et al. The distribution of bio-oil components with the effects of sub / supercritical ethanol and free radicals during cellulose liquefaction // *Bio-Resources*. 2016. Vol. 11. Issue 4. P. 9771–9788. <https://doi.org/10.15376/BIORES.11.4.9771-9788>

18. Aricò F., Tundo P. Dimethyl carbonate: a modern “green” reagent and solvent // *Russian Chemical Reviews*. 2010. Vol. 79. Issue 6. P. 479–489. <https://doi.org/10.1070/RC2010v079n06ABEH004113>

19. De Santi A., Galkin M.V., Lahive C., Deuss P.J., Barta K. Effective lignin-first fractionation of softwood lignocellulose using a mild dimethyl carbonate organosolv process // *ChemRxiv*. Preprint. 2019. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.10310945.v1>

20. Thynne J.C.J., Gray P. The methyl-radical-sensitized decomposition of gaseous dimethyl carbonate // *Transactions of the Faraday Society*. 1962. Vol. 58. P. 2403–2409.

21. Mazaheri H., Lee K.T., Bhatia S., Mohamed A.R. Sub/supercritical liquefaction of oil palm fruit press fiber for the production of bio-oil: Effect of solvents // *Bioresource Technology*. 2010. Vol. 101. Issue 19. P. 7641–7647. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.072>

22. Ilham Z., Saka S. Dimethyl carbonate as potential reactant in non-catalytic biodiesel production by supercritical method // *Bioresource Technology*. 2009. Vol. 100. Issue 5. P. 1793–1796. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.050>

23. Белевский В.Н. Ионные процессы в радиационной химии кислородсодержащих соединений в конденсированной фазе // *Вестник Московского университета. Серия: Химия*. 2001. Т. 42. N 3. С. 205–219.

REFERENCES

1. Balan V, Kumar S, Bals B, Chundawat S, Jin M, Dale B. Biochemical and thermochemical conversion of switchgrass to biofuels. In: Monti A. (ed.). *Switchgrass, green energy and technology*. Springer-Verlag London; 2012. Chapter 7. P. 153–185. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-2903-5_7

2. Mohan D, Pittman CU, Steele PH. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. *Energy & Fuels*. 2006;20:848–889. <https://doi.org/10.1021/ef0502397>

3. Timilsena YP, Abeywickrama CJ, Rakshit SK, Brosse N. Effect of different pretreatments on delignification pattern and enzymatic hydrolysability of miscanthus, oil palm biomass and typha grass. *Bioresource Technology*. 2013;135:82–88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.010>

4. Li H-Q, Li C-L, Sang T, Xu J. Pretreatment on *Miscanthus lutarioriparius* by liquid hot water for

efficient ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*. 2013;6. Article number 76. 10 p. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-76>

5. Lu J, Li X-Z, Zhao J, Qu Y. Enzymatic saccharification and ethanol fermentation of reed pretreated with liquid hot water. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 2012;2012. Article ID 276278. 9 p. <https://doi.org/10.1155/2012/276278>

6. Evstaf'ev SN, Chechikova EV. Transformations of wheat straw polysaccharides in dynamic conditions of subcritical autohydrolysis. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2016;42(7):700–706. <https://doi.org/10.1134/S1068162016070050>

7. Han M, Moon S-K, Kim Y, Chung B, Choi G-W. Bioethanol production from ammonia percolated wheat straw. *Biotechnology and Bio-process Engineering*. 2009;14:606–611. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0320-0>

8. Bui NQ, Fongarland P, Rataboul F, Dartiguelongue C, Charon N, Vallee C, et al. Controlled pinewood fractionation with supercritical ethanol: A prerequisite toward pinewood conversion into chemicals and biofuels. *Comptes Rendus Chimie*. 2018;21(6):555–562. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.03.008>
9. Evstafiev SN, Fomina ES, Privalova EA. Wheat straw ethanolysis under subcritical and supercritical conditions. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2012;38(7):713–716. <https://doi.org/10.1134/S1068162012070072>
10. Chumpoo J, Prasassarakich P. Bio-oil from hydro-liquefaction of bagasse in supercritical ethanol. *Energy & Fuels*. 2010;24(3):2071–2077. <https://doi.org/10.1021/ef901241e>
11. Li W, Xie X-A, Sun J, Fan D, Wei X. Investigation of cornstalk cellulose liquefaction in supercritical acetone by FT-TR and GC-MS methods. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2019;12(3):299–309. <https://doi.org/10.1080/17518253.2019.1643928>
12. Durak H, Aysu T. Thermochemical liquefaction of algae for bio-oil production in supercritical acetone/ethanol/isopropanol. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2016;111:179–198. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.11.021>
13. Fomina ES, Evstaf'ev SN. A comparative study of low-molecular-weight products extracted from wheat straw using ethanol and dimethyl carbonate. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2018;8(2):9–18. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-2-9-18>
14. Demirbaş A. Mechanisms of liquefaction and pyrolysis reactions of biomass. *Energy Conversion and Management*. 2000;41(6):633–646. [https://doi.org/10.1016/S0196-8904\(99\)00130-2](https://doi.org/10.1016/S0196-8904(99)00130-2)
15. Evstaf'ev SN, Privalova EA, Fomina ES. Chemism of wheat starw sub- and supercritical ethanolysis. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2012;1:61–68. (In Russian)
16. Fengel D, Vener G. *Wood. Chemistry, ultrastructure, reactions*. Moscow: Lesnaya promyshlennost'; 1988. 512 p. (In Russian)
17. Li W, Xie X-A, Tang C-Z, Li Y, Li L, Wang Y-L, et al. The distribution of bio-oil components with the effects of sub / supercritical ethanol and free radicals during cellulose liquefaction. *BioResources*. 2016;11(4):9771–9788. <https://doi.org/10.15376/BIORES.11.4.9771-9788>
18. Aricò F, Tundo P. Dimethyl carbonate: a modern “green” reagent and solvent. *Russian Chemical Reviews*. 2010;79(6):479–489. <https://doi.org/10.1070/RC2010v079n06ABEH004113>
19. De Santi A, Galkin MV, Lahive C, Deuss PJ, Barta K. Effective lignin-first fractionation of softwood lignocellulose using a mild dimethyl carbonate organosolv process. *ChemRxiv. Preprint*. 2019. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.10310945.v1>
20. Thynne JCJ, Gray P. The methyl-radical-sensitized decomposition of gaseous dimethyl carbonate. *Transactions of the Faraday Society*. 1962;58:2403–2409.
21. Mazaheri H, Lee KT, Bhatia S, Mohamed AR. Sub/supercritical liquefaction of oil palm fruit press fiber for the production of bio-oil: Effect of solvents. *Bioresource Technology*. 2010;101(19):7641–7647. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.072>
22. Ilham Z, Saka S. Dimethyl carbonate as potential reactant in non-catalytic biodiesel production by supercritical method. *Bioresource Technology*. 2009;100(5):793–1796. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.050>
23. Belevskii VN. Ionic processes in the radiation chemistry of oxygen-containing compounds in the condensed phase. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya: Khimiya*. 2001;42(3):205–219. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Евстафьев Сергей Николаевич,
д.х.н., профессор, заведующий кафедрой
химии и пищевой технологии,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ e-mail: esn@istu.edu

Фомина Елена Сергеевна,
к.х.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Sergei N. Evstaf'ev,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Head of the Laboratory of Food Technology,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ e-mail: esn@istu.edu

Elena S. Fomina,
Cand. Sci. (Chemistry),
Associate Professor
Irkutsk National Research Technical University
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,

Российская Федерация,
e-mail: lenafomina1982@yandex.ru

Тигунцева Надежда Павловна,
к.х.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: tignadezhda@yandex.ru

Шашкина Софья Сергеевна,
магистрант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: chiffa19@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 15.01.2021.
Одобрена после рецензирования 11.03.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.*

Russian Federation,
e-mail: lenafomina1982@yandex.ru

Nadezhda P. Tiguntceva,
Cand. Sci. (Chemistry),
Associate Professor
Irkutsk National Research Technical University
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: tignadezhda@yandex.ru

Sofia S. Shashkina,
Master Student,
Irkutsk National Research Technical University
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: chiffa19@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

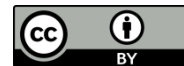
*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 15.01.2021.
Approved after reviewing 11.03.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 664.951+573.6

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-205-215>



Обоснование условий применения транsgлутаминазы в технологии формованной продукции из обводненного рыбного сырья

© Т.Н. Пивненко, Ю.В. Карпенко, Ю.М. Позднякова,
В.В. Кращенко, Р.В. Есипенко

Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет
(ФГБОУ ВПО «Дальрыбвтуз»), г. Владивосток, Российская Федерация

Резюме: Обоснованы условия применения препарата транsgлутаминазы ACTIVA® TG-TI (в сочетании со структурообразователями – желатином и хитозанами различной модификации) для применения в технологии формованной продукции из обводненного рыбного сырья на примере глубоководного объекта промысла – макруруса малоглазого. Показано, что сочетание различных видов структурообразователей обеспечивает сокращение времени становления гелей при незначительном изменении температур их становления и плавления. Добавление ферментного препарата приводит к образованию термостабильных гелей при увеличении их прочности в 1,5 раза. При формировании гелей из мышечной ткани макруруса в присутствии структурообразователей различной концентрации происходит снижение количества растворимых мышечных белков, наиболее выраженное в присутствии желатина и аскорбата хитозана. Измерения физико-химических параметров структурированных гелей мышечной ткани макруруса (влагоудерживающей способности, прочности на разрыв, активности воды) и их органолептические профили показали, что для использования в технологии формованной рыбной продукции можно рекомендовать внесение 3% желатина, 0,06% высокомолекулярного хитозана и 1% препарата транsgлутаминазы. Перевариваемость белковых компонентов полученных образцов не зависела от процесса ферментирования, суммарное накопление белка составило от 0,38 до 0,56% от массы образца. Общая биологическая ценность образцов при изучении их влияния на рост тест-культуры инфузории *T. pyriformis* составила от 78 до 134%.

Ключевые слова: транsgлутаминаза, желатин, хитозан, макрурус малоглазый, гелеобразование

Для цитирования: Пивненко Т.Н., Карпенко Ю.В., Позднякова Ю.М., Кращенко В.В., Есипенко Р.В. Обоснование условий применения транsgлутаминазы в технологии формованной продукции из обводненного рыбного сырья. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 2. С. 205–215. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-205-215>

Application of transglutaminase in moulded food processing from waterlogged fish raw materials

Tatiana N. Pivnenko, Yulia V. Karpenko, Yuliya M. Pozdnyakova,
Viktoria V. Kraschenko, Roman V. Esipenko

Far Eastern State Technical Fisheries University ("Dalrybvтуs"),
Vladivostok, Russian Federation

Abstract: Application conditions of the ACTIVA® TG-TI transglutaminase combined with setting agents (gelatine and chitosans of various modifications) are substantiated for moulded food processing from waterlogged fish raw materials targeted by deep-water fishery, i.e. giant grenadier (*Albatrossia pectoralis*). It was shown that combining different setting agents ensures time reduction of gel formation with a minor change in their development and melting temperatures. Adding an enzyme preparation leads to the formation of thermostable gels with a 1.5-fold increased strength. When forming gels from the grenadier muscle tissue in the presence of setting agents of different concentrations, the quality of soluble muscle proteins reduces, most prominently with gelatine and chitosan ascorbate. Physicochemical parameters of the structured gels prepared from the muscle tissue of giant grenadier (moisture retention capacity, tensile strength, water activity) and their organoleptic profiles were measured. Based on the results, we have shown that adding 3% of gela-

tine, 0.06% of high-molecular chitosan and 1% of transglutaminase may be employed for processing moulded fish products. The digestibility of the protein components in obtained samples did not depend on fermentation. The overall protein deposition was between 0.38 and 0.56% of the sample mass. The total biological value of samples ranged from 78 to 134% when studying their effect on the growth of *T. pyriformis* testing culture.

Keywords: transglutaminase, gelatine, chitosan, giant grenadier, gel formation

For citation: Pivnenko TN, Karpenko YuV, Pozdnyakov YuM, Kraschenko VV, Esipenko RV. Application of transglutaminase in moulded food processing from waterlogged fish raw materials. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):205–215. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-205-215>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время промышленный промысел глубоководных видов рыб имеет большие перспективы благодаря оснащению судов современными ярусно-постановочными комплексами. Одним из самых многочисленных глубоководных видов рыб северной части Тихого океана является макрурус малоглазый (*Albatrossia pectoralis*) [1]. По данным российских рыболовецких компаний, величину запасов этого объекта характеризует возможность вылова до 30–40 т в сутки, тогда как для традиционных объектов средний результат составляет 4–6 т в сутки. Также, по мнению сотрудников компании «Восток 1», макрурусы в недалеком будущем составят конкуренцию минтаю, самому массовому объекту Дальневосточного бассейна (<http://www.vostok1.com/produktsiya/makrurus/>). Однако макрурусы, несмотря на хорошие питательные свойства и большие запасы, остаются недоиспользованными из-за особенностей их химического состава: высокой обводненности мышечной ткани и неспособности миофибриллярных белков удерживать воду при различных способах технологической обработки [2].

Ранее нами была показана целесообразность сочетания двух различных типов структурообразователей – желатина и хитозана – в технологии желеобразных продуктов типа студней из мышечной ткани макруруса малоглазого. Полученные студни имеют доказанные высокие биологическую ценность, питательные и органолептические качества [3, 4]. Тем не менее данный вид кулинарной продукции имеет ограниченный потребительский спрос, предпочтительными являются формованные рыбные изделия, выдерживающие тепловую обработку без потери текстуры. Такие продукты из глубоководных объектов могут быть получены с помощью процесса реструктурирования с использованием фермента, обеспечивающего межмолекулярные белковые сшивки – трансглутаминазы (ТГ). Однако концентрация миофибриллярных белков в мышечной ткани макруруса настолько мала, что под действием вносимой экзогенной ТГ образующиеся белковые сшивки не обеспечивают достаточного укрепления структуры и повышения влагоудерживающей способности (ВУС) [3, 5, 6].

Известно, что желатин является хорошим субстратом для ТГ, а сшивки образуются между молекулами различных белков (например, между желатином и миозином) [7]. Поэтому применение желатина в процессе ферментативной реструктуризации мышечной ткани целесообразно и требует дополнительных исследований. Использование различных форм хитозана в этом процессе находится на начальной стадии исследований. В настоящее время имеются противоречивые данные об участии молекул хитозана в образовании сшивок между ними и молекулами белков [8, 9]. В то же время отмечают полезные качества хитозана благодаря его антимикробной и антиоксидантной активности, что обеспечивает увеличение сроков хранения продукции.

Цель данной работы – исследование процессов ферментативного структурообразования в модельных системах, включающих желатин, различные виды хитозана и миофибриллярные белки макруруса малоглазого для обоснования использования этих процессов в технологии изготовления рыбных продуктов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследований служил макрурус малоглазый – *Albatrossia pectoralis*, выловленный в Охотском море в 2019 г. Для исследования брали замороженные образцы сроком хранения 3–4 мес. Масса рыбы целиком составляла 2–2,4 кг при длине тела – 67–93 см.

В качестве структурообразователей использовали пищевой желатин (ГОСТ 11293-89), высокомолекулярный (588 кДа) хитозан (ООО «ФармОушенЛаб», Россия) в виде его уксуснокислого раствора и аскорбат хитозана, полученный в лабораторных условиях по методу, представленному в работе [10], а также препарат АСТИВА® TG-TI («Аджиномото Ко. Инк.», Япония). Данный препарат содержит 99% мальтодекстрина, активность ТГ по гидроксаматному методу [11] составляет 42–87 Е/г препарата, температурный оптимум – 40–50 °С, pH-оптимум – 5,0–7,0. Согласно рекомендациям, в предварительных экспериментах использовали 1%-ую концентрацию препарата.

Количество растворимого белка определяли по методу Лоури. Величину прочности образцов

на разрыв *H* определяли на приборе Валента ВЦ-1 с грибовидным индентором. Активность воды *A_w* определяли на гигрометре Rotronic модификации HugerPalm HP23-Aw-A при температуре 21±0,5 °С. ВУС определяли методом прессования навески под нагрузкой в 1 кг в течение 10 мин, расчет проводили по отношению разницы масс до и после прессования к массе исходного образца, выражали в процентах.

При исследовании гелеобразующей способности точки гелеобразования и плавления образцов оценивали визуально. Образцы помещали в пробирки, выдерживали на водяной бане при скорости повышения температуры воды на 1 °С за 2,5±0,5 мин. Температуру, при которой гель переходил в жидкое агрегатное состояние, отмечали как его температуру плавления, в твердое – температуру гелеобразования.

Для определения степени гидролиза белковых компонентов в полученных продуктах была использована модельная система, повторяющая последовательность переваривания в желудоч-

но-кишечном тракте при использовании пепсина в кислой среде, а трипсина – в слабощелочной [12]. Относительную биологическую ценность (ОБЦ) исследуемых образцов определяли методом культивирования инфузорий *Tetrahymena pyriformis* в растворе 0,1%-й пептонной воды с добавлением исследуемых компонентов [13]. Динамику роста инфузорий наблюдали в течение 4 сут., ОБЦ рассчитывали как процентное отношение количества выросших инфузорий на среде, содержащей исследуемые продукты, к контролю (среда с добавлением казеина).

Для характеристики органолептических свойств полученных продуктов использовали балльную шкалу, результаты оценки представлены в табл. 1.

Статистический анализ проводили с использованием прикладного пакета Statistica 6. Выборочные параметры: средняя арифметическая, *M*; стандартное отклонение, *σ*; объем анализируемой подгруппы, *n*. Уровень доверительной вероятности – 95%.

Таблица 1. Шкала для определения органолептических показателей образцов структурированных рыбных фаршей по групповому дескриптору «консистенция»

Table 1. Scale for determining the organoleptic characteristics of structured minced fish samples by the group descriptor «consistency»

| Единичные дескрипторы | | | | | | | | | |
|-----------------------|------|----------------|------|------------|------|----------------|------|----------------|------|
| Плотность | | Жесткость | | Упругость | | Хрупкость | | Рыхлость | |
| Описание | Балл | Описание | Балл | Описание | Балл | Описание | Балл | Описание | Балл |
| Плотная | 5 | Умеренная | 5 | Упругая | 5 | Отсутствует | 5 | Отсутствует | 5 |
| Уплотненная | 4 | | | | | | | | |
| Мягковатая | 3 | Очень жесткая | 3 | Слабая | 3 | Незначительная | 3 | Незначительная | 3 |
| Мягкая | 2 | | | | | | | | |
| Очень мягкая | 1 | Слабо выражена | 1 | Не упругая | 1 | Хрупкая | 1 | Рыхлая | 1 |

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На отечественном рынке комплексных пищевых добавок представлено большое количество препаратов ТГ микробиального происхождения (мТГ), соответствующих требованиям Технического регламента Таможенного Союза ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств». Наиболее известны такие коммерческие марки, как BioBond («Shanghai Kinry Pharmaceutical Co., Ltd.», Китай); ACTIVA® TG-TI («Аджиномото Ко. Инк.», Япония); Revada TG (BDF Natural Ingredients, Испания). Рекомендации по условиям использования препаратов при производстве мясных, молочных и рыбных продуктов включают параметры температуры и pH среды [14]. Качество получаемых ферментированных продуктов напрямую зависит от количества использованной добавки: как низкое, так и завышенное ее количество приводят к нежелательным результатам.

Физико-химические свойства желатина определяются пространственной структурой, молекулярно-массовым распределением, условиями среды (pH, ионная сила) и реакцией с другими компонентами, а функциональные – способностью к гелеобразованию и показателями прочности геля, временем гелеобразования, температурами становления и плавления, вязкостью и адгезией. Аминокислотный состав желатина свидетельствует о высокой концентрации именно тех аминокислот (глутаминовая кислота и лизин), боковые радикалы которых под действием ТГ образуют поперечные сшивки между отдельными молекулами белков и создают сетчатую структуру, удерживающую воду [4, 6].

Хитозан способен повышать структурно-механические свойства пищевых масс, соединять в упорядоченную уплотненную структуру фрагменты продуктов различной влажности¹ [15, 16]. При этом использование высокомолекулярного хитозана возможно только в виде его

¹Максимова С.Н., Сафронова Т.М., Полещук Д.В. Хитиновые материалы в технологии водных биоресурсов: учеб. пособие. СПб.: Лань. 2017. 176 с.

растворов при pH менее 5. Альтернативой ему могут служить низкомолекулярные производные, растворимые в воде, в частности, аскорбат хитозана.

Для исследования гелеобразующей способности желатина и хитозана измеряли температуру становления и температуру плавления гелей, а также время гелеобразования (рис. 1). После набухания в воде желатин нагревали для его растворения, после охлаждения фиксировали происходящие изменения.

При 1%-й концентрации желатина образуется продукт с выраженной текучестью, с увеличением концентрации упругость и плотность гелей возрастают при увеличении температур их становления и плавления. После достижения 6%-й концентрации желатина гель приобретает повышенную плотность и упругость, становится жестким и ломким. Для дальнейших исследований использовали концентрации желатина не выше 6,0%.

При добавлении мТГ в раствор желатина разных концентраций становление геля наблюдали в течение 3–5 мин при температуре 50 °С. Плавления геля не происходило даже при температуре инактивации фермента 90 °С в течение 30 мин и более. Это свидетельствует об образовании термостабильных ковалентных сшивок между белками.

Для исследования гелеобразующей способности комбинированного структурообразователя использовали высокомолекулярный кислоторастворимый хитозан и его водорастворимое производное – аскорбат хитозана. В качестве растворителей были взяты 1%-ая уксусная кислота и дистиллированная вода. Поскольку хитозан в твердофазном и растворенном состоянии имеет горький вяжущий вкус, то его применение в технологии пи-

щевых продуктов ограничено¹ [15, 16]. Приемлемыми органолептическими свойствами обладают образцы, в которых количество хитозана не превышает 0,1%, поэтому дальнейшие исследования проводили в диапазоне концентраций раствора хитозана 0,0–2,0% (см. рис. 1). С ростом концентрации хитозана температуры гелеобразования и плавления возрастали. Зависимость этих показателей от концентрации хитозана носила линейный характер во всех образцах. Время становления плотной гелеобразной структуры занимало от 40 до 50 мин, в то время как в контрольном образце, содержащем только желатин, оно составило 3–3,5 ч. В ряду концентраций раствора хитозана от 0,5 до 2,0% гелеобразующая способность комбинированного структурообразователя менялась незначительно. Так, температура плавления геля при увеличении концентрации хитозана от 0 до 2% возросла лишь на 12,2%; температура становления геля при тех же условиях возросла на 7,0%.

При добавлении мТГ в комбинированный раствор желатина и хитозана становление гелей происходило так же, как в предыдущем случае – в течение 5–7 мин. Плавления гелей также не наблюдали при 90 °С в течение 30 мин и более.

При использовании аскорбата хитозана отсутствует необходимость его растворения в кислых растворах, что является выгодным преимуществом. Исследования процесса реструктуризации белковых продуктов с этим препаратом ранее не проводилось. При изучении температурных характеристик становления и плавления гелей отличий между гелями желатина с добавлением как кислоты, так и водорастворимого хитозанов обнаружено не было. При добавлении мТГ в этом случае также были получены термоустойчивые продукты.

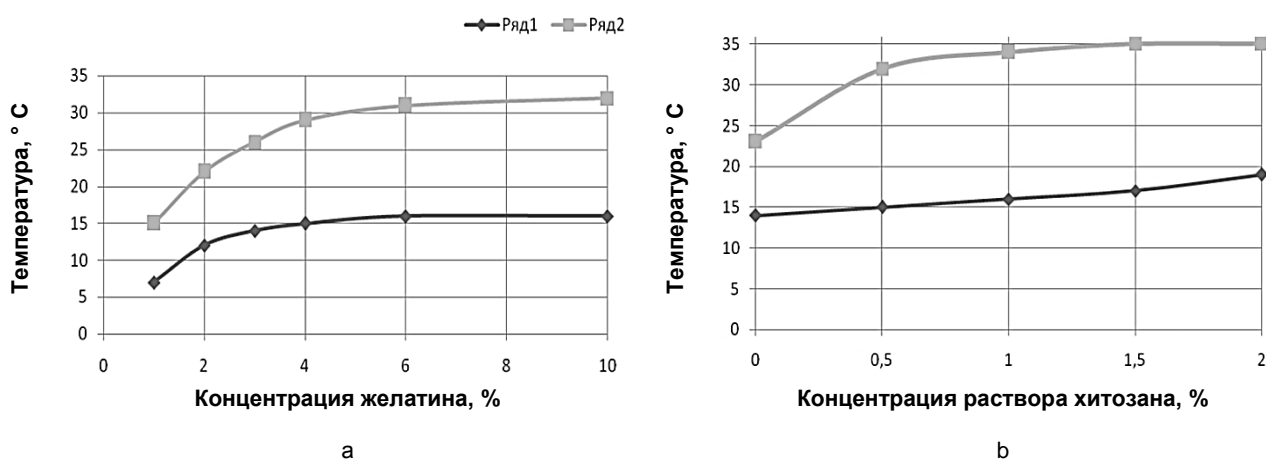


Рис. 1. Температура становления (ряд 1) и плавления (ряд 2) гелей:
а – при различных концентрациях желатина; б – при различных концентрациях хитозана в присутствии 3% желатина

Fig. 1. Temperature of formation (row 1) and melting (row 2) of gels:
а – at various gelatin concentration; б – at various chitosan concentrations in the presence of 3% gelatin

Далее полученные гели оценивали по изменению прочностных характеристик (рис. 2). В контрольных образцах (без мТГ) наиболее прочными оказались образцы, полученные без добавления хитозана, при этом различия были не существенными. Несмотря на то что органолептическая оценка гелей на основе желатина с различными концентрациями и кислото-, и водорастворимого хитозана позволяет характеризовать их как плотные и упругие, инструментальный контроль прочности на разрыв показал снижение этого показателя наиболее значительно в случае кислоторастворимого хитозана. Сопоставляя эти результаты с приведенными выше, можно говорить о том, что внесение хитозанов обоих типов влияет на процессы становления и плавления гелей, но не усиливает их прочность.

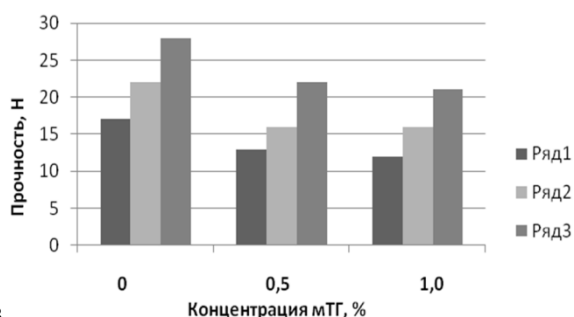


Рис. 2. Зависимость прочности гелей от концентрации мТГ: ряд 1 – 5% желатин; ряд 2 – 5% желатин + 2% раствор высокомолекулярного хитозана; ряд 3 – 5% желатин + 2% раствор аскорбата хитозана

Fig. 2. Dependence of the gels strength on the mTG concentration: row 1 – 5% gelatin; row 2 – 5% gelatin + 2% solution of high molecular weight chitosan; row 3 – 5% gelatin + 2% solution of chitosan ascorbate

Добавление мТГ приводило к увеличению прочности гелей во всех рассмотренных образцах, при этом рост этого показателя имел линейную зависимость от дозы ферментного препарата. Наиболее прочные гели были получены в присутствии только одного желатина, а наименее прочные – при добавлении аскорбата хитозана. Вероятно, молекулы хитозана не принимают участия в образовании поперечных сшивок, а в определенной степени снижают концентрацию белкового субстрата, за счет чего может снижаться частота сшивок.

На основании полученных данных были проведены эксперименты по изучению влияния желатина и хитозанов в присутствии мТГ на формирование структуры мышечной ткани рыб на примере макруруса малоглазого, миофибрилярные белки которого, как показано ранее, не способны к достаточному влагоудержанию и сохранению структуры. За основу способа получения формованных рыбных продуктов с применением дополнительных белковых и углеводных субстратов была положена ранее разработанная

технология получения рыбных студней без ферментирования [17]. Для этого макрурус размораживали до температуры -5°C , разделяли на филе, предварительно грубо измельчали, куттеровали 15 ± 2 мин при скорости вращения ножей 3000 об./мин. В процессе куттерования вносили 1,5% поваренной соли, подготовленные структурообразователи, препарат мТГ. Полученную смесь помещали в полимерные стаканы массой 150 г, укупоривали их и нагревали до 85°C в центре образца и выдерживали 5 мин. После охлаждения проводили измерения. Полученные образцы рассматривали как модельные для получения полуфабрикатов или продуктов, готовых к употреблению.

Для исследования влияния мТГ на формирование гелей из мышечной ткани макруруса и их физико-химические и органолептические свойства в присутствии различных концентраций желатина были приготовлены следующие образцы (табл. 2).

Таблица 2. Наименование и состав образцов для исследования влияния мТГ (1% от массы) на свойства гелей из мышечной ткани макруруса

Table 2. Names and composition of samples for studying the effect of mTG (1% by weight) on the properties of gels from the grenadier muscle tissue

| Шифр образца | Состав образца, % ингредиентов к массе фарша | | |
|--------------|--|----------------------------|-------------------|
| | Желатин | Высокомолекулярный хитозан | Аскорбат хитозана |
| A1 | 2 | – | – |
| A2 | 3 | – | – |
| A3 | 5 | – | – |
| B1 | 3 | 0,02 | – |
| B2 | 3 | 0,03 | – |
| B3 | 3 | 0,06 | – |
| V1 | 3 | – | 0,02 |
| V2 | 3 | – | 0,03 |
| V3 | 3 | – | 0,06 |

Как показано ранее, при реакции полимеризации в мышечной ткани различных объектов происходит снижение содержания растворимых белков, что является косвенным подтверждением прохождения ферментативной реакции [18]. На рис. 3 показано изменение количества растворимых белков в полученных образцах.

В качестве нулевой точки на рис. 3, *b* и 3, *c* даны образцы, содержащие только 3% желатина без хитозанов. Количество растворимого белка в присутствии желатина и мТГ действительно снижается, что свидетельствует о прохождении ферментативной реакции между белками мышечной ткани и желатином. При этом наибольшее снижение (почти вдвое) показано для 1%-й концентрации желатина. Дальнейший рост концентрации желатина приводит к увеличению содержания растворимого белка. Возможным объяснением этого факта является то, что при повы-

шении концентрации желатина ферментативные сшивки в большей степени образуются между молекулами этого белка и не затрагивают молекулы миофибриллярных белков макруруса.

Добавление 2%-х и 3%-х растворов высокомолекулярного хитозана в присутствии желатина приводит к слабому росту количества белка в растворе, однако существенно меньшему, чем для образцов в отсутствии структурообразователей (см. рис. 3). Повышение концентрации хитозана до 5% приводит к снижению изучаемого показателя, он становится значимо меньше, чем полученный в присутствии только одного желатина. Следовательно, можно предположить, что хитозан либо сам принимает участие в ферментативной реакции в качестве субстрата, либо облегчает образование связей между желатином и миофибриллярными белками.

Поскольку аскорбат хитозана хорошо растворяется в воде, в фаршевую смесь его добавляли

в сухом виде, где он растворялся благодаря наличию большого количества воды в самом фарше. Количество растворимого белка в образцах с добавлением аскорбата хитозана значительно снизилось по сравнению с тем, что наблюдали в образце сравнения (A2), и было почти вдвое меньше, чем в образцах с высокомолекулярным хитозаном и желатином, а также только с одним желатином. В табл. 3 представлены физико-химические характеристики образцов. При увеличении концентрации желатина от 2 до 5% прочность полученных образцов возросла в 2 раза. Хотя эта величина почти в 20 раз меньше, чем полученная для геля чистого желатина в присутствии мТГ, образцы сохраняли форму как до, так и после термообработки. Одновременно наблюдалось достоверное увеличение ВУС несмотря на некоторое увеличение содержания воды.

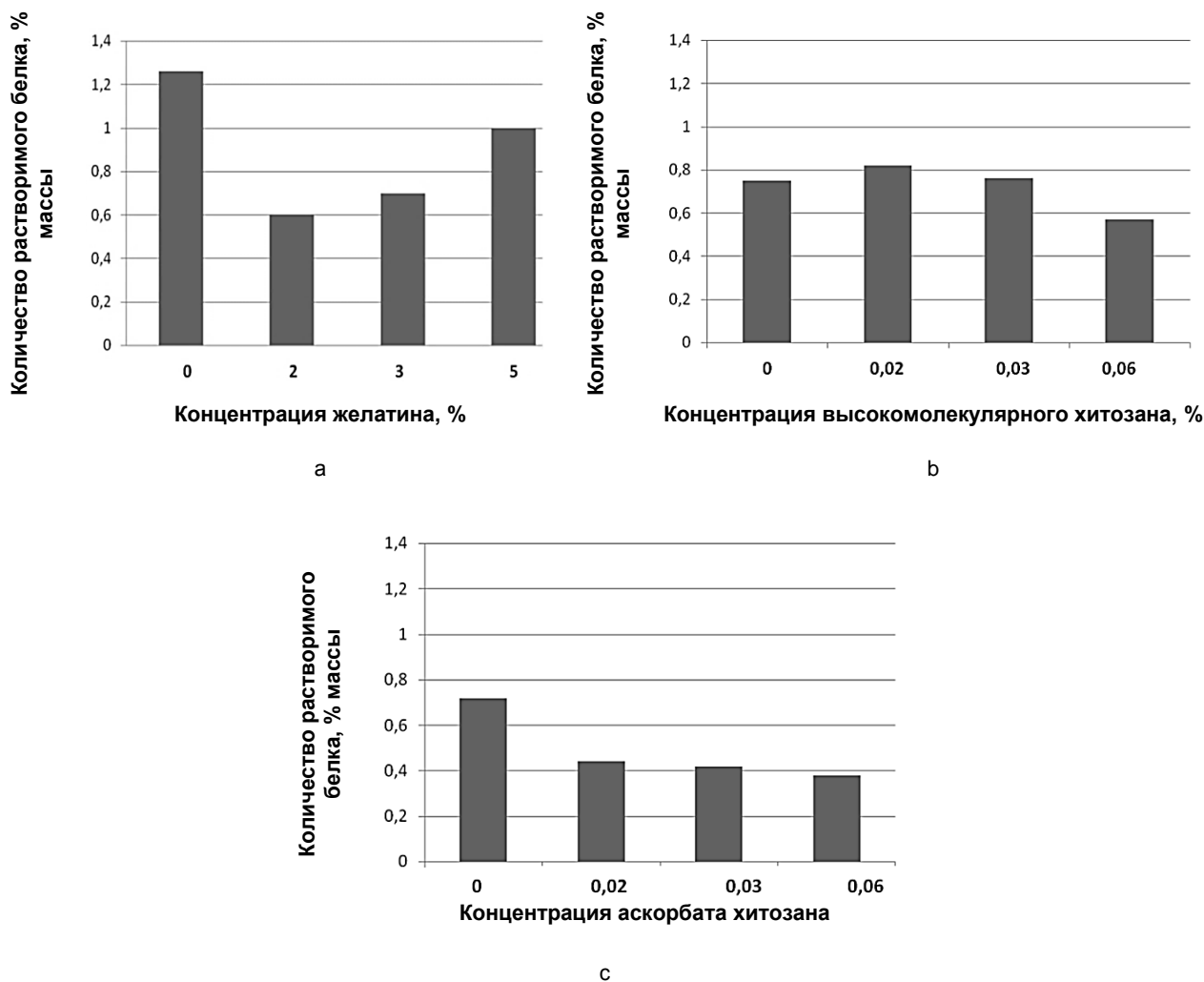


Рис. 3. Зависимость содержания растворимого белка в образцах мышечной ткани макруруса в присутствии мТГ: а – желатин; б – 3% желатин + высокомолекулярный хитозан; в – 3% желатин + аскорбат хитозана

Fig. 3. Dependence of the soluble protein content in grenadier muscle tissue samples in the presence of mTG: а – gelatin; б – 3% gelatin + high molecular weight chitosan; в – 3% gelatin + chitosan ascorbate

Таблица 3. Физико-химические характеристики образцов ферментированной мышечной ткани макруруса при добавлении структурообразователей

Table 3. Physicochemical characteristics of fermented grenadier muscle tissue samples with the addition of structure formers

| Шифр образца | Прочность на разрыв, <i>H</i> | Активность воды, <i>A_w</i> | Массовая доля воды, % | ВУС, % |
|--------------|-------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------|
| A1 | 0,5±0,01 | 0,770±0,41 | 69,51±4,0 | 34,20±2,0 |
| A2 | 0,83±0,07 | 0,858±0,40 | 73,21±3,1 | 43,52±1,7 |
| A3 | 1,01±0,06 | 0,801±0,57 | 73,38±4,4 | 53,14±2,9 |
| B1 | 0,76±0,02 | 0,902±0,11 | 73,23±3,0 | 40,40±2,2 |
| B2 | 1,57±0,02 | 0,880±0,10 | 72,78±2,4 | 45,29±3,0 |
| B3 | 0,83±0,03 | 0,889±0,13 | 75,93±2,3 | 52,07±3,1 |
| B1 | 0,16±0,04 | 0,929±0,21 | 72,41±1,9 | 57,43±3,2 |
| B2 | 0,27±0,07 | 0,922±0,27 | 74,61±2,4 | 52,23±3,5 |
| B3 | 0,35±0,01 | 0,978±0,25 | 69,86±2,0 | 51,92±2,0 |

Примечание. *n* = 4; *p* < 0,05.

Вода является дисперсной средой для многих химических реакций и метаболизма микроорганизмов в продуктах питания. Активность воды, *A_w*, влияет на срок годности, безопасность, структуру и запах пищевых продуктов [19]. Снижение этого показателя от 1 до 0,2 приводит к значительному замедлению химических и ферментативных реакций. Наименьшее значение *A_w* получено для образца с концентрацией желатина 2%, при его 3%-й концентрации оно несколько увеличивается, а затем вновь снижается до 0,801, что значительно ниже, чем для фарша макруруса без добавок – 0,898. Таким образом, мТГ можно рассматривать как реагент, обеспечивающий эффективное водосвязывание в присутствии мышечных белков и желатина.

Добавление высокомолекулярного хитозана в образцы, содержащие 3% желатина, приводило к неоднозначному изменению их прочности. Наиболее значительно возрос этот показатель при добавлении 3%-го раствора хитозана, что выше, чем у образца с добавлением только 3% желатина (образец сравнения). При 2%-й концентрации этот показатель был меньше, а при 5%-й концентрации совпадал с образцом сравнения. Значения *A_w* были существенно выше, чем у образца сравнения при незначительном различии между образцами группы Б. Массовая доля воды в этих же образцах также была практически равной, но при этом ВУС возросла.

По прочности образцы с аскорбатом хитозана были значительно слабее, чем полученные в двух предыдущих опытах, что находится в соответствии с более высоким содержанием воды. Однако при этом значительно возросли значения ВУС и *A_w* по сравнению с обоими предыдущими опытами. Величины всех результатов достоверны, однако находятся в противоречии друг с другом. Для объяснения полученной картины необходимо будет в дальнейшем обратиться к подробному анализу структуры полученных образцов и изучению взаимодействия аскорбата хитозана и миофибриллярных белков.

Результаты сенсорной оценки образцов

представлены на рис. 4 в виде органолептических профилей согласно табл. 1.

Образцы во всех группах имели приятный рыбный запах и вкус. При этом А1 имел плотную, но недостаточно упругую консистенцию, при нарезании проявлял некоторую рыхлость, ощущения от продукта при разжевывании определялись как суховатые; А2 имел плотную упругую консистенцию, был хорошо нарезаем, хорошо разжевывался, не вызывал нежелательных реакций; А3 имел плотную и упругую консистенцию, при нарезании проявлял повышенную жесткость и хрупкость, при разжевывании определялась крупитчатость. По всем исследованным свойствам образец А2 имел лучшие показатели и был использован в дальнейшей работе.

В группе Б для образца Б1 показана мягковатая консистенция, недостаточная упругость, по текстуре он был сопоставим с плотным суфле, хорошо нарезаем, имел незначительное количество отделившегося прозрачного бульона; Б2 обладал плотной консистенцией, был хорошо нарезаем при незначительном отделении бульона; Б3 имел плотную и жесткую структуру, при нарезании был рыхлым, крупитчатым, без отделения бульона. По указанным показателям наиболее приемлемым посчитали образец Б2 несмотря на наличие синерезиса. Этого недостатка можно избежать при фасовании в полиамидную оболочку, при этом отделившийся бульон будет включаться в структуру продукта в процессе охлаждения при перемешивании путем барботирования. Образец Б1 можно считать приемлемым вариантом при получении текстуры типа суфле.

В группе В образцы В1 и В2 совпали по органолептическим показателям – имели мягкую неупругую консистенцию, сопоставимую с мягким суфле мажущей консистенции, имели незначительную рыхлость, крупитчатость. В3 имел мягковатую, недостаточно упругую консистенцию, был рыхлым и крупитчатым. Все образцы имели текстуру типа суфле от мягкой до плотной консистенции или жесткого крема. После извлечения

из потребительской тары сохраняли форму.

Наиболее перспективным образцом по физико-химическим и органолептическим свойствам был признан образец Б2, содержащий 3% желатина и 0,06% высокомолекулярного хитозана.

При исследовании на перевариваемость пищеварительными ферментами в модельных экспериментах было показано, что образование низкомолекулярных белковых компонентов после последовательного переваривания пепсином и трипсином образцов, полученных в присутствии мТГ и без нее, было практически одинаковым.

Суммарное накопление переваренного белка составило от 0,38 до 0,56% от массы образца. Это позволяет говорить о том, что полученные продукты сохраняют хорошую усвояемость в желудочно-кишечном тракте. Общая биологическая ценность образцов при изучении их влияния на рост тест-культуры инфузории *Tetrahymena pyriformis* составила от 78 до 134% по отношению к контролю (гидролизату коллагена). Самый высокий показатель получен для образца А2, содержащего фарш макруруса, желатин и мТГ.

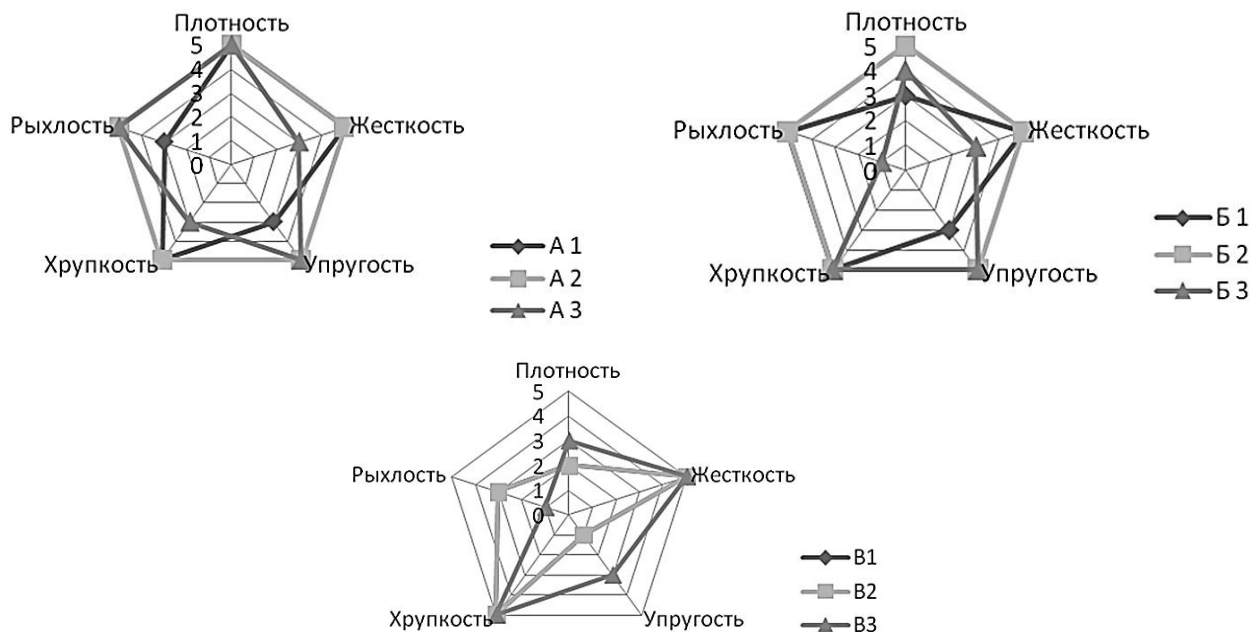


Рис. 4. Органолептические профили реструктурированных рыбных продуктов по групповому дескриптору «консистенция» (B1 и B3 совпадают)

Fig. 4. Organoleptic profiles of restructured fish products by group descriptor «consistency» (B1 and B3 are the same)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены исследования по воздействию мТГ на формирование гелей из мышечной ткани макруруса малоглазого в присутствии желатина и хитозанов различной модификации – структурообразователей и потенциальных субстратов мТГ, образующих межбелковые ковалентные сшивки. Получены косвенные доказательства протекания ферментативной реакции: снижение количества растворимого белка и образование прочных термоустойчивых структур. Исследования показателей, характеризующих технологические качества образцов, подтвердили их соответствие требованиям, предъявляемым к формованной рыбной продукции. Это позволяет рассматривать мТГ в качестве реагента, обеспечивающего структуризацию и эффективное связывание воды в системе, содержащей лабильные мышечные белки макруруса малоглазого, желатина и хитозана.

Выявлены оптимальные концентрации структурообразователей для получения плотных продуктов с упругой консистенцией, хорошо нарезаемых и разжевываемых, с приятным рыбным запахом и вкусом, не вызывающих нежелательных реакций. Исследования влияния на рост и развитие тест-организмов – инфузорий *T. pyriformis*, показали, что ОБЦ образцов сравнима с установленной для полноценных белков. Высокая степень перевариваемости в условиях, моделирующих процессы желудочно-кишечного тракта, свидетельствует о доступности и усвояемости белков после ферментирования мТГ. Таким образом, проведенные экспериментальные работы и полученные данные позволяют дать обоснование условий применения мТГ, желатина и хитозана в технологии формованных продуктов на основе фарша макруруса малоглазого.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тупоногов В.Н., Новиков Н.П. Макрурусы – важный резерв глубоководного промысла в дальневосточных морях // Рыбное хозяйство. 2016. N 6. С. 54–60.
2. Crapo C., Himelbloom B., Pfitzenreuter R., Lee C. Causes for soft flesh in giant grenadier (*Albatrossia pectoralis*) filets // Journal of Aquatic Food Product Technology. 1999. Vol. 8. Issue 3. P. 55–68. https://doi.org/10.1300/J030v08n03_05
3. Pivnenko T.N., Karpenko Y.V., Krashchenko V.V., Pozdnyakova Y.M., Esipenko R.V. Biochemical factors affecting the quality of products and the technology of processing deep-sea fish, the giant grenadier *Albatrossia pectoralis* // Journal of Ocean University of China. 2020. Vol.19. Issue 3. P. 681–690. <https://doi.org/10.1007/s11802-020-4273-z>
4. Карпенко Ю.В. Кращенко В.В., Пивненко Т.Н. Обоснование технологии обогащенных белком желированных рыбных продуктов из макруруса малоглазого // Технология и товаро-ведение инновационных пищевых продуктов. 2019. N 5 (58). С. 39–45.
5. Karaulova E.P., Yakush E.V. The comparative study of myofibrillar proteins of skeletal muscles of some deep-sea fish species. // Journal of Fisheries Sciences. 2017. Vol. 11. Issue 2. P. 001–008.
6. Listrat A., Leuret B., Louveau I., Astruc T., Bonnet M., Lefaucheur L., et al. How muscle structure and composition influence meat and flesh // The Scientific World Journal. 2016. Vol. 2016. Article ID 3182746. <https://doi.org/10.1155/2016/3182746>
7. Schrieber R., Gareis H. *Gelatine handbook. Theory and industrial practice*. Wiley-VCH. 2007. 350 p. <https://doi.org/10.1002/9783527610969.fmatter>
8. Benjakul S., Phatcharat S., Tammatinna A., Visessanguan W., Kishimura H. Improvement of gelling properties of lizardfish mince as influenced by microbial transglutaminase and fish freshness // Journal of Food Science. 2008. Vol. 73. Issue 6. P. S239–S246. <https://doi.org/10.1111/j.17454514.2003.tb00266.x>
9. Gómez-Guillén M.C., Montero P., Solas M.T., Pérez-Mateos M. Effect of chitosan and microbial transglutaminase on the gel forming ability of horse mackerel (*Trachurus spp.*) muscle under high pressure // Food Research International. 2005. Vol. 38. Issue 1. P. 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.09.004>
10. Малинкина О.Н., Гегель Н.О., Шиповская А.Б. Влияние изоформы аскорбиновой кислоты на гидродинамическое поведение макромолекул аскорбата хитозана в водных растворах // Известия Саратовского университета. Серия: Химия. Биология. Экология. 2019. Т.19, N.2. С. 152–164. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-2-152-164>
11. Cochón A.C., Miño L.A., San Martín de Vi L.C. Early increases in transglutaminase activity and polyamine levels in a Mallory-Denk body mouse model // Toxicology Letters. 2010. Vol.199. Issue 2. P. 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.08.018>
12. Покровский А.А., Ертанов И.Д. Атакуемость белков пищевых продуктов протеолитическими ферментами *in vitro* // Вопросы питания. 1965. N 3. С. 38–44.
13. Wheatley D.N., Rasmussen L., Tiedtke A. Tetrahymena: a model for growth, cell cycle and nutritional studies with biotechnological potential // BioEssays. 1994. Vol.16. Issue 5. P. 367–371. <https://doi.org/10.1002/bies.950160512>
14. Motoki M., Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing // Trends in Food Science & Technology. 1998. Vol. 9. Issue 5. P. 204–210. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00038-7)
15. Борисенко А.А. Молекулярное прогнозирование гидратационной способности пищевых биополимеров // Вестник АПК Ставрополя. 2016. N 3 (23). С.10–14.
16. Гафуров Ю.М. Хитозан: свойства, опыт применения. Владивосток: Дальнаука. 2011. 136 с.
17. Кращенко В.В., Карпенко Ю.В. Влияние бинарного структурообразователя на свойства рыбных студней // Известия ТИНРО. 2014. Т. 179. С. 272–278. <https://doi.org/10.26428/1606-9919-2014-179-272>
18. Ahhmed A.M., Kuroda R., Kawahara S., Ohta K., Nakade K., Aoki T., et al. Dependence of microbial transglutaminase on meat type in myofibrillar proteins cross-linking // Food Chemistry. 2009. Vol.112. Issue 2. P. 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.078>
19. Barbosa-Cánovas G.V., Fontana A.J., Schmidt S.J., Labuza T.P. (eds.). Water activity in foods: fundamentals and applications. Blackwell Publishing. 2008. 440 p. <https://doi.org/10.1002/9780470376454>

REFERENCES

1. Tuponogov VN, Novikov NP. Grenadier as an important reserve of Far Eastern deep-sea fisheries. *Rybnoe khozyaistvo = Fisheries*. 2016;6:54–60. (In Russian)
2. Crapo C, Himelbloom B, Pfitzenreuter R, Lee C. Causes for soft flesh in giant grenadier (*Albatrossia pectoralis*) filets. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 1999;8(3):55–68. https://doi.org/10.1300/J030v08n03_05
3. Pivnenko TN., Karpenko YV, Krashchenko VV, Pozdnyakova YM, Esipenko RV. Biochemical factors affecting the quality of products and the technology of processing deep-sea fish, the giant grenadier *Albatrossia pectoralis*. *Journal of Ocean University of China*. 2020;19(3):681–690. <https://doi.org/10.1007/s11802-020-4273-z>
4. Karpenko YV, Krashchenko VV, Pivnenko TN. Basing of technology of gelled fish products from giant grenadier enriched by a protein. *Tekhnologiya i tovarovedenie innovatsionnykh*

pishchevykh produktov = Technology and merchandising of the innovative foodstuffs. 2019;5:39–45. (In Russian)

5. Karaulova EP, Yakush EV. The comparative study of myofibrillar proteins of skeletal muscles of some deep-sea fish species. *Journal of Fisheries Sciences*. 2017;11(2):001–008.

6. Listrat A, Lebret B, Louveau I, Astruc T, Bonnet M, Lefaucheur L, et al. How muscle structure and composition influence meat and flesh. *The Scientific World Journal*. 2016;2016. Article ID 3182746. <https://doi.org/10.1155/2016/3182746>

7. Schrieber R, Gareis H. *Gelatine handbook. Theory and industrial practice*. Wiley-VCH; 2007. 350 p. <https://doi.org/10.1002/9783527610969.fmatter>

8. Benjakul S, Phatcharat S, Tammattinna A, Visessanguan W, Kishimura H. Improvement of gelling properties of lizardfish mince as influenced by microbial transglutaminase and fish freshness. *Journal of Food Science*. 2008;73(6):S239–S246. <https://doi.org/10.1111/j.17454514.2003.tb00266.x>

9. Gómez-Guillén MC, Montero P, Solas MT, Pérez-Mateos M. Effect of chitosan and microbial transglutaminase on the gel forming ability of horse mackerel (*Trachurus* spp.) muscle under high pressure. *Food Research International*. 2005;38(1):103–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.09.004>

10. Malinkina ON, Gegel NO, Shipovskaya AB. Influence of ascorbic acid isoforms on the hydrodynamic behavior of chitosan ascorbate macromolecules in aqueous solution. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya = Izvestiya of Saratov University. Series: Chemistry. Biology. Ecology*. 2019;19(2):152–164. (In Russian) <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-2-152-164>

11. Cochón AC, Miño LA, San Martín de Vi LC.

Early increases in transglutaminase activity and polyamine levels in a Mallory-Denk body mouse model. *Toxicology Letters*. 2010;199(2):160–165. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.08.018>

12. Pokrovskii AA, Ertanov ID. Attackability of food proteins by proteolytic enzymes *in vitro*. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 1965;3:38–44. (In Russian)

13. Wheatley DN, Rasmussen L, Tiedtke A. Tetrahymena: a model for growth, cell cycle and nutritional studies with biotechnological potential. *BioEssays*. 1994;16(5):367–371. <https://doi.org/10.1002/bies.950160512>

14. Motoki M, Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*. 1998;9(5):204–210. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00038-7)

15. Borisenko AA. Molecular prediction of hydration ability of food biopolymers. *Vestnik APK Stavropol'ya = Agricultural Bulletin of Stavropol Region*. 2016;3:10–14. (In Russia)

16. Gafurov YuM. *Chitozan: properties, practical using*. Vladivostok: Dal'nauka; 2011. 136 p. (In Russia)

17. Krashchenko VV, Karpenko YuV. Effect of binary builder on properties of fish jellies. *Izvestiya TINRO*. 2014;179:272–278. (In Russian) <https://doi.org/10.26428/1606-9919-2014-179-272-278>

18. Ahmed AM, Kuroda R, Kawahara S, Ohta K, Nakade K, Aoki T, et al. Dependence of microbial transglutaminase on meat type in myofibrillar proteins cross-linking. *Food Chemistry*. 2009;112(2):354–361. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.078>

19. Barbosa-Cánovas GV, Fontana AJ, Schmidt SJ, Labuza TP (eds.). *Water activity in foods: fundamentals and applications*. Blackwell Publishing; 2008. 440 p. <https://doi.org/10.1002/9780470376454>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Пивненко Татьяна Николаевна,
д.б.н., профессор, профессор кафедры
пищевой биотехнологии,
Дальневосточный государственный
технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б,
Российская Федерация,
✉ e-mail: tnpivnenko@mail.ru

Карпенко Юлия Валериевна,
к.т.н., ассистент кафедры
пищевой биотехнологии,
Дальневосточный государственный
технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б,
Российская Федерация,
e-mail: bozhuk@mail.ru

Позднякова Юлия Михайловна,
к.т.н., директор НИИ инновационных
биотехнологий,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Tatiana N. Pivnenko,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Food Biotechnology Department,
Far Eastern State Technical Fisheries University,
52b, Lugovaya St., Vladivostok, 690087,
Russian Federation,
✉ e-mail: tnpivnenko@mail.ru

Yulia V. Karpenko,
Cand. Sci. (Engineering), Assistant,
Food Biotechnology Department,
Far Eastern State Technical Fisheries University,
52b, Lugovaya St., Vladivostok, 690087,
Russian Federation,
e-mail: bozhuk@mail.ru

Yuliya M. Pozdnyakova,
Cand. Sci. (Engineering),
Director of SRI «Innovative Biotechnologies»,

Дальневосточный государственный
технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б,
Российская Федерация,
e-mail: pozdnyakova.julia@yandex.ru

Кращенко Виктория Владимировна,
к.т.н., доцент, заведующая кафедрой
пищевой биотехнологии,
Дальневосточный государственный
технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б,
Российская Федерация,
e-mail: victoriy_vl@mail.ru

Есипенко Роман Владимирович,
к.т.н., младший научный сотрудник
Научно-инновационного центра
«Морские биотехнологии»,
Дальневосточный государственный
технический рыбохозяйственный университет,
690087, г. Владивосток, ул. Луговая, 52б,
Российская Федерация,
e-mail: festfu@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 23.10.2020.
Одобрена после рецензирования 14.01.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.*

Far Eastern State Technical Fisheries University,
52b, Lugovaya St., Vladivostok, 690087,
Russian Federation,
e-mail: pozdnyakova.julia@yandex.ru

Viktoriya V. Kraschenko,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Head of the Food Biotechnology Department,
Far Eastern State Technical Fisheries University,
52b, Lugovaya St., Vladivostok, 690087,
Russian Federation,
e-mail: victoriy_vl@mail.ru

Roman V. Esipenko,
Cand. Sci. (Engineering), Junior Researcher,
Research Innovation Center
«Marine Biotechnology»,
Far Eastern State Technical Fisheries University,
52b, Lugovaya St., Vladivostok, 690087,
Russian Federation,
e-mail: festfu@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

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

*The article was submitted 23.10.2020.
Approved after reviewing 14.01.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 601.4: 616.931

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-216-227>



Разработка подходов скрининга высокоспецифичных бактериофагов на основе биоинформационного анализа структур CRISPR-Cas систем *Corynebacterium diphtheriae*

© Л.А. Степаненко*, Ю.П. Джиоев*, В.И. Злобин*, А.Ю. Борисенко*,
В.П. Саловарова **, Н.А. Арефьева **, И.Ж. Семинский *, И.В. Малов*

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

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

Резюме: Целью настоящего исследования являлась разработка подходов скрининга высокоспецифичных бактериофагов на основе биоинформационного анализа структур CRISPR-Cas систем бактерий на примере *Corynebacterium diphtheriae*. Предложен алгоритм биоинформационного поиска и анализа структур CRISPR-Cas систем бактерий и скрининга фагов через спейсерные последовательности CRISPR-кассет в геномах штаммов *Corynebacterium diphtheriae*. В качестве объекта выбраны 22 полногеномные последовательности, загруженные из базы данных GenBank. Из них у 21 штамма обнаружены CRISPR-Cas системы. При помощи нескольких алгоритмов поиска в CRISPR-Cas системах исследуемых штаммов в 23,8% случаев определено наличие одной CRISPR-касеты, в 76,2% случаев – двух. Рядом с кассетами идентифицирован полный набор Cas-генов, характерный для двух типов систем: Type-I Subtype-I-E и Type-II Subtype-II-C. Анализ спейсерного состава CRISPR-кассет показал наличие от 3 до 42 спейсеров в кассетах. Совокупное количество выявленных спейсеров составило 297. Из них 64 спейсера повторялись в двух и более CRISPR-кассетах, 159 спейсеров не имели повторов. Три пары исследуемых штаммов из данной группы имели полное совпадение спейсерных и консенсусных последовательностей, хотя были выделены в разное время и в разных странах мира. Для подтверждения их единого происхождения был проведен филогенетический анализ. Скрининг фагов через спейсерные последовательности показал наибольшее соответствие спейсеров протоспейсерам фагов, специфичных для бактерий семейства *Mycobacteriaceae*, *Gordoniaceae*, *Streptomyetaceae*, *Corynebacteriaceae*, относящихся к одному типу *Actinobacteria*. Был выявлен один штамм, обладающий множественной антибиотикорезистентностью, и с помощью данной технологии определена его предполагаемая устойчивость к бактериофагам. Таким образом, разработанная технология биоинформационного анализа позволила получить сведения о предполагаемой устойчивости CRISPR-Cas системы исследуемых штаммов к обнаруженным фагам, что в перспективе дает возможность создания платформы для разработки подходов персонализированной фаготерапии.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*, бактериофаг, CRISPR-Cas система, спейсер, протоспейсер, биоинформатика, антибиотикорезистентность

Для цитирования: Степаненко Л.А., Джиоев Ю.П., Злобин В.И., Борисенко А.Ю., Саловарова В.П., Арефьева Н.А., Семинский И.Ж., Малов И.В. Разработка подходов скрининга высокоспецифичных бактериофагов на основе биоинформационного анализа структур CRISPR-Cas систем *Corynebacterium diphtheriae*. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 2. С. 216–227. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-216-227>

Development of screening approaches of highly specific bacteriophages based on bioinformatic analysis of CRISPR-Cas structures of *Corynebacterium diphtheriae* systems

Lilia A. Stepanenko*, Yuri P. Dzhioev*, Vladimir I. Zlobin*, Andrey Yu. Borisenko*,
Valentina P. Salovarova**, Nadezhda A. Arefieva**, Igor Zh. Seminsky*, Igor V. Malov*

* Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation

** Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: This study aims to develop approaches for screening highly specific bacteriophages based on bioinformatic analysis of CRISPR-Cas structures of bacterial systems using the example of *Corynebacterium diphtheriae*. We proposed an algorithm for bioinformatic search and analysis of CRISPR-Cas structures of bacteria systems and phage screening through spacer sequences of CRISPR-cassette in genomes of *Corynebacterium* strains. 22 genome-wide sequences loaded from the GenBank database were selected as the target. 21 strains out of 22 had CRISPR-Cas systems. Using several search algorithms in CRISPR-Cas systems, one CRISPR-cassette was found in 23.8% of the tested strains and two in 76.2% of cases. Near the cassettes, a complete set of Cas-genes was identified, characteristic of two types of systems: Type-I Subtype-I-E and Type-II Subtype-II-C. The conducted analysis of the CRISPR-cassette spacer composition showed 3 to 42 spacers in the cassette. The cumulative total number of identified spacers amounted to 297, 64 spacers of which repeated in two or more CRISPR-cassettes, 159 spacers had no replicates. The three pairs of strains under study from this group had a complete match of spacer and consensus sequences, although they were isolated at different times and in multiple countries. A phylogenetic analysis was performed to confirm their common origin. Phages screening through the spacer sequences showed the highest compliance of the spacers with the phages protospacers, characteristic of the bacteria of the Mycobacteriaceae, Gordoniaceae, Streptomycetaceae, Corynebacteriaceae family belonging to the Actinobacteria type. One strain with multiple antibiotic resistance was identified, and its expected bacteriophage resistance was determined using this method. Thus, the developed bioinformatic analysis technology allowed the information on the expected resistance of the tested strains CRISPR-Cas system against the detected phages to be obtained, which in the long term enables the development of a platform of personalised bacteriophage treatment approaches.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*, bacteriophage, CRISPR-Cas system, spacer, protospacer, bioinformatics, antibiotic resistance

For citation: Stepanenko LA, Dzhioev YuP, Zlobin VI, Borisenko AYu, Salovarova VP, Arefieva NA, Seminsky I.Zh, Malov IV. Development of screening approaches of highly specific bacteriophages based on bioinformatic analysis of CRISPR-Cas structures of *Corynebacterium diphtheriae* systems. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):216–227. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-216-227>

ВВЕДЕНИЕ

Система CRISPR-Cas вот уже несколько лет широко применяется в генетической инженерии как простая, дешевая и быстрая технология редактирования генома. В 2020 г. Нобелевский комитет Королевской шведской академии наук вручил Нобелевскую премию по химии за один из самых востребованных методов современной генетической инженерии, известный как «генетические ножницы», или CRISPR-Cas9. [1]. Однако изучение структуры и функционирования систем CRISPR-Cas в качестве противовирусных иммунных агентов бактерий не менее интересно и увлекательно. Данные исследования посвящены изучению разнообразия и функциональности естественных систем бактерий.

CRISPR-Cas системы представляют собой системы антивирусного иммунитета, которые присутствуют в большинстве архей и многих бактерий и защищают их от вирусов, мобильных генетических элементов и прочей инородной ДНК [2]. В организации CRISPR-Cas систем принято выделять три структуры: CRISPR-кассеты, лидерную последовательность и кластер Cas-генов. CRISPR-кассеты представляют собой набор коротких повторяющихся последовательностей, в промежутках которых находятся уникальные спейсерные сайты (26–72 п.н.), комплементарные участкам фагов и плазмид, с которы-

ми данная бактерия встречалась и к которым может проявлять устойчивость [3]. Спейсеры полностью интегрированы в геном клетки и передаются ее потомкам при делении. Перед CRISPR-кассетой расположена лидерная последовательность (рис. 1). Данная структура содержит промотор и обеспечивает однонаправленную транскрипцию CRISPR-касеты [4].

Современная классификация CRISPR-Cas систем основана на организации кластера Cas-генов и на особенностях архитектуры кодируемых ими белковых комплексов. Согласно последней версии CRISPR-Cas разделяют на 2 класса, объединяющих 6 типов [5–7]. Механизм действия CRISPR-Cas систем обычно разделяют на три стадии [8]:

- 1) приобретение новых спейсеров или адаптация;
- 2) транскрипция CRISPR-касеты и процессинг пре-crPHK на короткие направляющие crPHK-фрагменты;
- 3) интерференция, во время которой происходит специфическое распознавание и уничтожение чужеродных генетических элементов.

Эта базовая идея лежит в основе работы всех систем CRISPR-Cas, однако, детали у разных типов и подтипов, а, следовательно, у разных видов микроорганизмов различаются.



Рис. 1. Упрощенная схема строения CRISPR-Cas системы

Fig. 1. Simplified diagram of the structure of the CRISPR-Cas system

Дифтерия – инфекционное заболевание, которое является одним из самых тяжелых бактериальных инфекций человека. До введения массовой вакцинации она уносила тысячи жизней, особенно среди детского населения [9]. В течение болезни токсинпродуцирующие *C. diphtheriae* локально колонизируют слизистую оболочку и производят токсин, который всасывается в кровоток и вызывает поражение сердечной мышцы, демиелинизацию нервных волокон, что приводит к параличу неба и глазных мышц [10]. На сессии ВОЗ в 1993 г. был сделан вывод о том, что для ликвидации дифтерии требуется охват иммунизацией не менее 90% детей и 75% взрослых¹. Однако массовый отказ от вакцинации и, как следствие, снижение уровня коллективного иммунитета способствуют сохранению циркуляции токсигенных *C. diphtheriae* и возникновению спорадических случаев заболевания в определенных группах риска. Поскольку вакцинация против дифтерии проводится с использованием инактивированной формы токсина, считается, что она не предотвращает бессимптомную колонизацию и скрытую передачу токсигенных штаммов патогена, что способствует их циркуляции среди населения. Поэтому токсигенные бактерии дифтерии по-прежнему остаются объектом интенсивного эпидемиологического надзора [11].

Начиная с конца 1990-х гг. во всем мире появляется все больше информации о возникновении кожных и инвазивных форм инфекции (бактериемия и эндокардит), вызванных нетоксигенными штаммами, смертность от которых достигает более 40% [12, 13]. Можно предположить, что появление и распространение данных штаммов связано с изменением эволюционной динамики *C. diphtheriae*, что требует более глубокого изучения и понимания популяционной генетики.

В основе клинического лечения дифтерии лежит применение дифтерийной сыворотки, оказывающей антитоксическое действие, тем самым предотвращая или уменьшая системные эффекты токсина [14]. Тем не менее противомикробное лечение имеет решающее значение,

поскольку способствует уничтожению как токс-положительных, так и токс-отрицательных бактерий и ограничивает передачу инфекции среди населения. Пенициллин и эритромицин являются препаратами первой линии для лечения дифтерии. Однако во многих регионах мира все чаще сообщается о снижении восприимчивости или полной резистентности *C. Diphtheriae* к данным препаратам или возникновению штаммов с множественной лекарственной устойчивостью [15–18]. При этом нужно учитывать, что гены антибиотикорезистентности посредством горизонтального переноса приводят к возникновению устойчивости к противомикробным препаратам во множестве сублиний [19]. Таким образом, сохранение на фоне проводимой вакцинопрофилактики циркуляции токсигенных форм *C. Diphtheriae*, появление тяжелых заболеваний, вызванных нетоксигенными штаммами, и распространение штаммов с множественной антибиотикорезистентностью диктуют необходимость поиска альтернативных методов борьбы с ними. В связи с этим в медицинской практике вновь возрастает интерес к применению бактериофагов для лечения инфекций бактериального происхождения. Изучение структурных и функциональных особенностей CRISPR-Cas системы бактерий позволит разработать современные подходы в лечении сложных инфекционных заболеваний путем создания таргетной фаговой терапии.

Цель данного исследования – разработка подходов скрининга высокоспецифичных бактериофагов на основе биоинформационного анализа структур CRISPR-Cas систем бактерий на примере *Corynebacterium diphtheriae*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работу проводили на базе лаборатории молекулярной вирусологии и биотехнологии НИИ биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета. Для достижения указанной цели был разработан концептуальный дизайн исследований (рис. 2).

¹Эпидемия дифтерии в Европе: чрезвычайная ситуация и ответные меры. Отчет о заседании ВОЗ (Санкт-Петербург, 5–7 июля 1993 г.). СПб.: б.и., 1993. 162 с.



Рис. 2. Схема концептуального дизайна исследований

Fig. 2. Research conceptual design diagram

Объектом служили полногеномные последовательности *Corynebacterium diphtheriae*, загруженных из базы данных GenBank. На исследование были взяты штаммы, у которых обнаружены CRISPR-Cas системы, – 21 из 22

Для поиска CRISPR-Cas систем использовали методы программного моделирования MacSyFinder (Macromolecular SystemFinder, ver. 1.0.2). Поиск структурных и функциональных характеристик Cas-генов осуществляли при помощи вспомогательных программных пакетов makeblastdb (ver.2.2.28) и HMMER (ver.3.0). Для детекции и анализа CRISPR-кассет в геноме использовали онлайн-приложения CRISPI: a CRISPR Interactive database (<http://crispi.genouest.org>); CRISPRFinder (<http://crispr.u-psud.fr/Server>). Для поиска фагов расшифрованные спейсерные последовательности в формате FASTA были загружены в онлайн-приложение CRISPRTarget (http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html) и Mycobacteriophage Database (<http://phagesdb.org/blast/>). При филогенетическом анализе выравнивание и построение дере-

ва было проведено с помощью программы MEGA X по методу максимального правдоподобия (ML –Maximum-Likelihood) с использованием бутстрэп-анализа (число реплик –1000). Для «укоренения» дерева к выборке исследуемых организмов добавлены еще два штамма другого вида, но одного рода: *Corynebacterium minutissimum strain NCTC10288* (NZ_LS483460.1) и *Corynebacterium minutissimum strain NCTC10285* (NZ_LR134339.1), которые составили аутгруппу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При анализе было установлено, что в 47,6% случаев штаммы *Corynebacterium diphtheriae* были выделены от больных с диагнозом дифтерия ротоглотки, в 19,1% случаев – с диагнозом эндокардит, в 4,8% случаев – из смыва из бронхов от пациентов с пневмонией на фоне рака легких. В 28,8% случаев были представлены только отсекаемые геномы коллекционных штаммов. При этом у больных с диагнозом дифтерия ротоглотки *Corynebacterium diphtheriae* была выделена: в 38,1% случаев – из носоглотки, в 14,3% – из смыва из бронхов. У пациентов с диагнозом эндокардит во всех случаях возбудитель был выделен из крови, это составило 19% всех случаев.

При помощи нескольких алгоритмов поиска в CRISPR-Cas системах исследуемых штаммов в 23,8% случаев было определено наличие одной CRISPR-кассеты, в 76,2% случаев – двух.

Рядом с кассетами во всех случаях был идентифицирован полный набор Cas-генов, характерный для систем Type-I Subtype-I-E (cas2, cas1, cas5, cas7, cas6, cse2gr11, cas8, cas3) и Type-II Subtype-II-C (cas2, cas1, cas9), что свидетельствует о функциональной активности CRISPR-систем исследуемых штаммов (рис. 3, 4). В четырех штаммах содержался набор Cas-генов двух типов.



Рис. 3. Схематичное изображение CRISPR-Cas системы Type-I Subtype-I-E в геноме штаммов *Corynebacterium diphtheria* (данные из GenBank, NZ_LN831026.1)

Fig. 3. Schematic representation of the CRISPR-Cas system Type-I Subtype-I-E in the genome of *Corynebacterium diphtheria* strains (data from GenBank, NZ_LN831026.1)

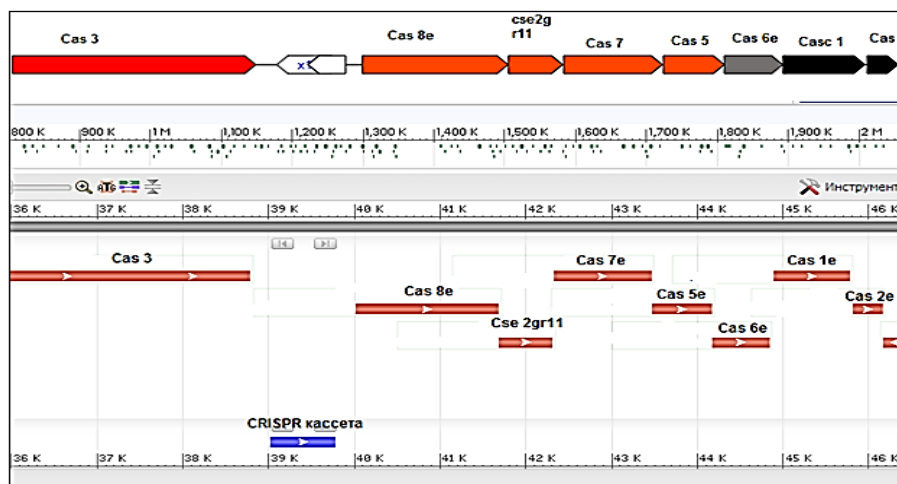


Рис. 4. Схематичное изображение CRISPR-Cas системы Type-II Subtype-II-C в геноме штаммов *Corynebacterium diphtheria* (данные из GenBank, NC_016785.1)

Fig. 4. Schematic representation of the CRISPR-Cas system Type-II Subtype-II-C in the genome of *Corynebacterium diphtheria* strains (data from GenBank, NC_016785.1)

Анализ спейсерного состава CRISPR-кассет показал, что количество спейсеров в кассетах составляло от 3 до 42. Совокупное количество выявленных спейсеров составило 297. Из них 64 спейсера повторялись в двух и более CRISPR-кассетах, 159 спейсеров не имели повторов. В пяти штаммах внутри кассет регистрировались спейсерные повторы. Наличие одинаковых спейсеров в кассетах различных штаммов может свидетельствовать о том, что при встрече бактерий с одним и тем же вирусом или плазмидой из

их ДНК вырезается и интегрируется в локус CRISPR-кассеты в качестве нового спейсера не случайно выбранный фрагмент генома, а универсальный.

Консенсусные последовательности повторов всех найденных CRISPR-кассет были достаточно разнообразны, что может свидетельствовать как о различном происхождении исследуемых штаммов, так и о широкой циркуляции данных штаммов и обмене генетической информацией между представителями одного или разных видов (рис. 5).



Рис. 5. Консенсусные последовательности повторов CRISPR-кассет штаммов *Corynebacterium diphtheriae*

Fig. 5. Consensus sequences of CRISPR cassette repeats of strains *Corynebacterium diphtheriae*

При исследовании CRISPR-кассет вызвало интерес следующее: в трех парах исследуемых штаммов отмечалось 100%-е совпадение спейсерных и консенсусных последовательностей повторов. При этом в одной паре первый штамм был выделен в Индии в 1973 г. из носоглотки пациента с диагнозом дифтерия, второй изолирован от больного в Нью-Йорке в 1896 г. Последний штамм являлся высокотоксигенным и поэтому использовался в лабораторных целях для производства токсина. Во второй паре оба штамма впервые были выделены в США в 1954 и 1969 гг. и относились к эталонным коллекционным. Однако первый штамм отличался наличием интегрированного нового спейсера, расположенного около лидерной последовательности. В последней паре оба штамма были выделены в Бразилии (Рио-де-Жанейро): один был изолирован из носоглотки больного дифтерией в 1981 г., другой – из образца крови пациента, страдающего смертельным эндокардитом, в 1993 г. Таким образом, исследуемые штаммы имели в составе CRISPR-кассет спейсеры с одинаковой нуклеотидной последовательностью, хотя были выде-

лены в разное время и в разных регионах мира. Проведенный анализ подтверждает единое происхождение штаммов, которые в результате циркуляции изменялись генетически, приобретая новые свойства, но при этом, возможно, сохраняли структуру CRISPR-кассеты. Для подтверждения данного высказывания был проведен филогенетический анализ всех исследуемых штаммов. Построение дерева проводилось по последовательностям 16S rRNA (рис. 6).

На картине филогенетического дерева четко прослеживается образование трех кластерных групп от одного узла (единого предка). При этом каждая исследуемая пара (выделены цветом на рисунке) имеет единый внутренний узел и, следовательно, одно происхождение. Таким образом, мы видим единое происхождение новых штаммов, которые в процессе дивергенции приобретают новые свойства и признаки, при этом сохраняя структуру CRISPR-кассет. Данный подход может быть использован для проведения эпидемиологических исследований при расследовании вспышек заболевания.

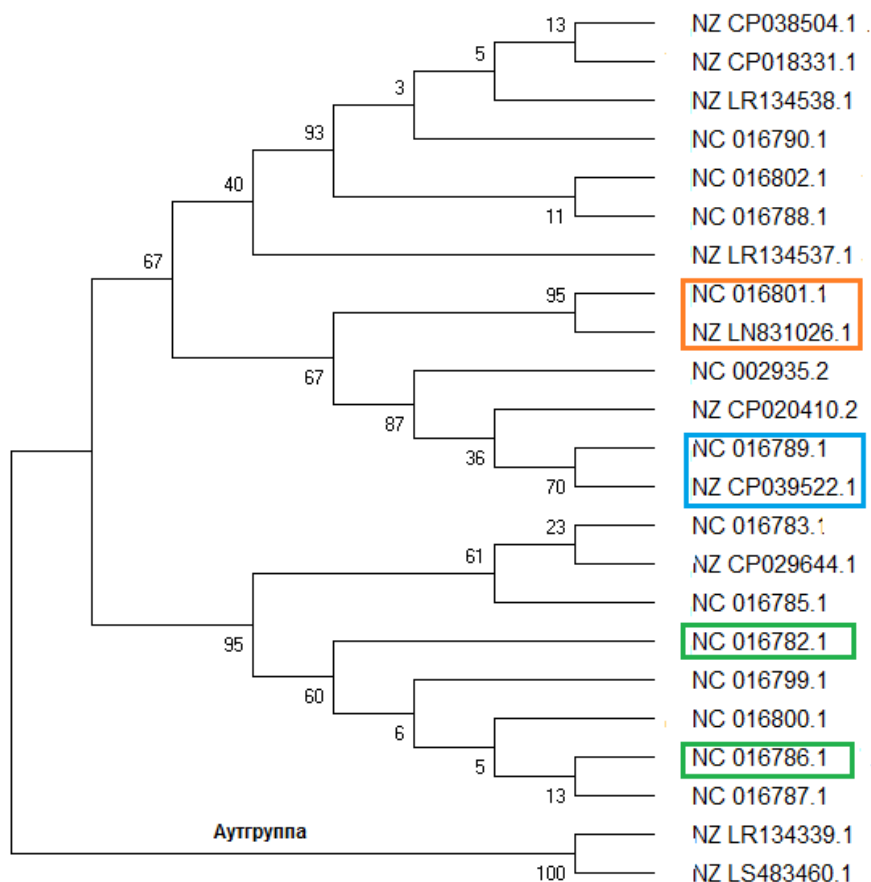


Рис. 6. Филогенетическое дерево исследуемых штаммов *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium minutissimum* (аутгруппа) построенное на основании нуклеотидных последовательностей 16S rRNA

Fig. 6. Phylogenetic tree of the studied strains of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium minutissimum* (outgroup), built on the basis of 16S rRNA nucleotide sequences

В результате скрининга спейсерных последовательностей было установлено, что во всех исследуемых штаммах в CRISPR-кассетах выявлено их соответствие протоспейсерам фагов бактерий семейства *Mycobacteriaceae*, *Gordoniaceae*, *Streptomyetaceae*, *Corynebacteriaceae*, относящихся к одному типу *Actinobacteria* (табл. 1).

Нужно отметить, что к большинству так называемых «древних» спейсеров, которые, как правило, располагаются отдаленно от лидерной последовательности, не было выявлено полного соответствия протоспейсерам фагов из известных баз данных. Анализ бактериофагов показал, что все фаги бактерий семейства *Gordoniaceae* были выделены впервые из почвы. Это объясняется тем, что бактерии данного семейства устойчивы к неблагоприятным условиям существования и участвуют в биоремедиации благодаря способности утилизировать хлорароматические соединения. *Corynebacterium phage* были разделены на две группы. Первая группа впервые была выделена из биовара *Corynebacterium pseudotuberculosis Equi*

39, являющегося грамположительным плеоморфным факультативным внутриклеточным патогеном. Впервые он был изолирован от буйвола в Египте, у которого было диагностировано отечное заболевание кожи. Вторая группа была впервые выделена из обогащенной пробы сточных вод в США (штат Алабама). *Mycobacterium phage* впервые были изолированы из почвы в США (штат Колорадо) в разные годы. *Streptococcus phage* являлся умеренным бактериофагом *Streptococcus oralis*, который был выделен из наддесневого зубного налета человека в Швейцарии. В двух штаммах спейсеры имели наибольшее соответствие провирусному гену фага SK137 (*skl*). Данный ген (*skl*) кодирует фермент пептидогликангидролазу, участвующий в лизисе пептидогликана грамположительных бактерий. На основании этого можно предположить, что грамположительная *Corynebacterium diphtheriae* приобрела данный спейсер для формирования устойчивости к данному фагу (табл. 2).

Таблица 1. Разнообразие спейсеров и соответствующих им протоспейсеров фагов в геномах штаммов *Corynebacterium diphtheriae*

Table 1. Diversity of spacers and corresponding phage protospacers in the genomes of *Corynebacterium diphtheriae* strains

| Спейсер | Номер доступа GenBank | Протоспейсер | Номер доступа GenBank | Кол-во нуклеотидных замен |
|------------|-----------------------|---|--|---------------------------|
| Spacer 3_1 | Nctc11397 | Gordonia phage Phorbesphlower | MN175604 | 2 |
| Spacer 3_1 | Nctc11397 | Gordonia phage Kuwabara | MN892485 | 2 |
| Spacer1_1 | Nz_cp029644.1 | Corynebacterium phage Bran | MK977714 | 1 |
| Spacer2_1 | | Streptococcus phage PH10 | FN391954 | 4 |
| Spacer2_1 | | Phage SK137 Proviralhol gene | AM040720 | 4 |
| Spacer4_1 | Nz_cp038504.1 | Corynebacterium phage LGCM-V8, LGCM-V6, LGCM-V9, LGCM-V7, LGCM-V5, LGCM-V4, LGCM-V3 | KY624615 KY624612 KY624616 KY624614 KY624613 KY624611 KY624610 | 0 |
| Spacer3_1 | Nz_cp018331.1 | Streptococcus phage PH10 | FN391954 | 4 |
| Spacer3_1 | | Phage SK137 Proviralhol gene | AM040720 | 4 |
| Spacer12_1 | Nz_cp039522.1 | Corynebacterium phage LGCM-V8, LGCM-V6, LGCM-V9, LGCM-V7, LGCM-V5, LGCM-V4, LGCM-V3 | KY624615 KY624612 KY624616 KY624614 KY624613 KY624611 KY624610 | 2 |
| Spacer2_1 | Nc_016782.1 | Corynebacterium phage LGCM-V8, LGCM-V6, LGCM-V9, LGCM-V7, LGCM-V5, LGCM-V4, LGCM-V3, LGCM-VI, LGCM-V2 | KY624615 KY624612 KY624616 KY624614 KY624613 KY624611 KY624610 KY566218 KY613597 | 2 |
| Spacer1_1 | Nc_016800.1 | Corynebacterium phage Stiles Corynebacterium phage Dina Corynebacterium phage Stab | MK977710 MK977706 MK937613 | 5 |

Продолжение таблицы 1

| | | | | |
|-------------|-------------|---|--|---|
| | | Corynebacterium phage Lederberg Corynebacterium phage Bran Corynebacterium phage Samw | MK977712 MK977714 MH727560 | |
| Spacer1_1 | Nc_016801.1 | Corynebacterium phage Bran | MK977714 | 1 |
| Spacer 3_1 | | Gordonia phage Phorbesphlower | MN175604 | 2 |
| Spacer 3_1 | | Gordonia phage Kuwabara | MN892485 | 2 |
| Spacer 2_1 | Nc_016786.1 | Corynebacterium phage LGCM-V8, LGCM-V6, LGCM-V9, LGCM-V7, LGCM-V5, LGCM-V4, LGCM-V3, LGCM-VI, LGCM-V2 | KY624615 KY624612 KY624616 KY624614 KY624613 KY624611 KY624610 KY566218 KY613597 | 2 |
| Spacer 12_1 | Nc_016789.1 | Corynebacterium phage LGCM-V4, LGCM-V3, LGCM-VI, LGCM-V2 | KY624611 KY624610 KY566218 KY613597 | 2 |
| Spacer 1_1 | Nc_016790.1 | Corynebacterium phage Stiles Corynebacterium phage Dina Corynebacterium phage Stab Corynebacterium phage Troy corynebacterium phage Lederberg Corynebacterium phage Bran Corynebacterium phage Samw | MK977710 MK977706 MK937613 MH926061 MK977712 MK977714 MH727560 | 5 |

Таблица 2. Информация об идентифицированных бактериофагах

Table 2. Information on identified bacteriophages

| Бактериофаги | Источник выделения фага | Место выделения фага |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Gordonia phage Phorbes Phlower | почва | США, Пельсильвания |
| Gordonia phage Kuwabara | почва | США: Гринсборо, Северная Каролина |
| Streptococcus phage PH10 | наддесневой зубной налет человека | Швейцария |
| Phage SK137 proviralhol gene | профар Streptococcus mitis | Испания, Мадрид |
| Corynebacterium phage LGCM-V8, LGCM-V6, LGCM-V9, LGCM-V7, LGCM-V5, LGCM-V4, LGCM-V3 | кожа больного отеком буйвола | Египет |
| Corynebacterium phage Stiles Corynebacterium phage Dina Corynebacterium phage StAB Corynebacterium phage Troy Corynebacterium phage Lederberg Corynebacterium phage Bran Corynebacterium phage SamW | обогащенные пробы сточных вод | США: Бирмингем, Алабама |

Полученная информация о количестве и степени разнообразия бактериофагов свидетельствует о генетических взаимодействиях в эволюционной истории как между представителями разных видов внутри семейства, так и между представителями разных семейств внутри одного типа.

Интересно отметить, что в CRISPR-кассетах исследуемых штаммов наблюдалось соответствие участка одного спейсера протоспейсерам нескольких фагов бактерий одного семейства. Это может свидетельствовать о том, что бактерия «разумно» приобретает новые спейсеры из участков ДНК, консервативных для фагов бактерий одного семейства. Таким образом, бактерия одним спейсером может «защититься» от не-

скольких фагов.

По данным, представленным в базе данных NCBI, один из 22 исследуемых штаммов (NC_016800.1) обладал множественной антибиотикорезистентностью. Данный штамм имел наименьший спейсерный состав (три спейсера) и универсальную последовательность консенсусных повторов. При скрининге фагов было определено, что только первый спейсер имел наибольшее соответствие протоспейсерам семи *Corynebacterium phage*, представленным в табл. 3. Таким образом, была определена не только устойчивость данного штамма к антибактериальным препаратам, но и к бактериофагам.

Таблица 3. Разнообразие протоспейсеров фагов соответствующих первому спейсеру в геноме антибиотикорезистентного штамма *Corynebacterium diphtheria* (NC_016800.1)

Table 3. Diversity of phage protospacers corresponding to the first spacer in the genome of antibiotic-resistant strain *Corynebacterium diphtheria* (NC_016800.1)

| Спейсер | Протоспейсер | Номер доступа GenBank |
|------------|--|-----------------------|
| Spacer 1_1 | <i>Corynebacterium</i> phage Stiles | MK977710 |
| | <i>Corynebacterium</i> phage Dina | MK977706 |
| | <i>Corynebacterium</i> phage StAB | MK937613 |
| | <i>Corynebacterium</i> phage Troy | MH926061 |
| | <i>Corynebacterium</i> phage Lederberg | MK977712 |
| | <i>Corynebacterium</i> phage Bran | MK977714 |
| | <i>Corynebacterium</i> phage SamW | MH727560 |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, данный подход позволяет провести подробный биоинформационный и сравнительный анализ структур CRISPR-Cas систем бактерий, определить их тип, дать полную характеристику спейсерных структур CRISPR-кассет исследуемых бактерий. Скрининг фагов через спейсерные последовательности CRISPR-кассет в геномах штаммов *Corynebacterium diphtheriae* позволил нам получить информацию о генетических взаимодействиях между представителями разных видов внутри одного типа. Данные исследования также позволили определить предполагаемую устойчивость CRISPR-Cas систем исследуемых штаммов к обнаруженным фагам. Дальнейшее применение разработанного биоинформационного алгоритма анализа дает возможность отбора целевых фагов и в перспективе позволит создать платформу для разработки технологий персонализированной фотерапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ивашко С. Нобелевская премия по химии досталась открывателям самого быстрого и точного метода генетического редактирования // Коммерсантъ Наука. 2020. N 33. С. 5.
2. Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria // *Nucleic Acids Research*. 2013. Vol. 41. Issue 8. P. 4360–4377. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt157>
3. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin // *Microbiology (Reading)*. 2005. Vol. 151. Issue 8. P. 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
4. Bhaya D., Davison M., Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation // *Annual Review of Genetics*. 2011. Vol. 45. P. 273–297. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>
5. 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. Vol. 13. Issue 11. P. 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicr03569>
6. Shmakov S., Smargon A., Scott D., Cox D., Pyzocha N., Yan W., et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems // *Nature Reviews Microbiology*. 2017. Vol. 15. Issue 3. P. 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>
7. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems // *Current Opinion in Microbiology*. 2017. Vol. 37. P. 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>
8. Hille F., Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance // *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*. 2016. Vol. 371. Issue 1707. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0496>
9. Byard R.W. Diphtheria – 'The strangling angel' of children // *Journal of Forensic and Legal Medicine*. 2013. Vol. 20. Issue 2. P. 65–68. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2012.04.006>
10. Zasada A.A. *Corynebacterium diphtheriae* infections currently and in the past // *Przegląd Epidemiologiczny*. 2015. Vol. 69. Issue 3. P. 439–444.
11. Mattos-Guaraldi A.L., Moreira L.O., Damasco P.V., Hirata R. Diphtheria remains a threat to health in the developing world—an overview // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003. Vol. 98. Issue 8. P. 987–993. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000800001>
12. Zasada A.A. Nontoxigenic highly pathogenic clone of *Corynebacterium diphtheriae*, Poland, 2004–2012 // *Emerging Infectious Diseases*. 2013. Vol. 19. Issue 11. P. 1870–1872. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130297>
13. Kolodkina V., Titov L., Sharapa T., Grimont F., Grimont P.A.D., Efstratiou A. Molecular epidemiology of *C. diphtheriae* strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus // *BMC Infectious Diseases*. 2006. Vol. 6. P. 129–137. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-129>
14. Sharma N.C., Efstratiou A., Mokrousov I., Mutreja A., Das B., Ramamurthy T. Diphtheria // *Nature Reviews Disease Primers*. 2019. Vol. 5. Issue 1. P. 81. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0131-y>
15. Paveenkittiporn W., Sripakdee S., Koobkratok O., Sangkitporn S., Kerdsin A. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of outbreak-associated *Corynebacterium diphtheriae* in Thai-

land, 2012 // *Infection, Genetics and Evolution*. 2019. Vol. 75. P. 104007. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104007>

16. Kneen R., Pham N.G., Solomon T., Tran T.M., Nguyen T.T., Tran B.L., et al. Penicillin vs. erythromycin in the treatment of diphtheria // *Clinical Infectious Diseases*. 1998. Vol. 27. Issue 4. P. 845–850. <https://doi.org/10.1086/514959>

17. Pereira G.A., Pimenta F.P., Wink dos Santos F.R., Damasco P.V., Hirata R., Mattos-Guaraldi A.L. Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008. Vol. 103. Issue 5. P. 507–510. <https://doi.org/10.1590/s0074-0276200>

8000500019

18. Husada D., Soegianto S.D.P., Kurniawati I.S., Hendrata A.P., Irawan E., Kartina L., et al. First-line antibiotic susceptibility pattern of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Indonesia // *BMC Infectious Diseases*. 2019. Vol. 19. Issue 1. P. 1049. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4675-y>

19. Hennart M., Panunzi L.G., Rodrigues C., Gaday Qu., Baines S.L., Barros-Pinkelning M., et al. Population genomics and antimicrobial resistance in *Corynebacterium diphtheriae* // *Genome Medicine*. 2020. Vol. 12. Issue 1. P. 107. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00805-7>

REFERENCES

1. Ivashko S. The Nobel prize in chemistry went to the discoverers of the fastest and most accurate method of genetic editing. *Kommersant" Nauka*. 2020;33:5. (In Russian)

2. Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(8):4360–4377. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt157>

3. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading)*. 2005;151(8):2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>

4. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual Review of Genetics*. 2011;45:273–297. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>

5. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2015;13(11):722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>

6. Shmakov S, Smargon A, Scott D, Cox D, Pyzocha N, Yan W, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2017;15(3):169–182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>

7. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*. 2017;37:67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>

8. Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*. 2016;371(1707):20150496. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0496>

9. Byard RW. Diphtheria – 'The strangling angel' of children. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. 2013;20(2):65–68. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2012.04.006>

10. Zasada AA. *Corynebacterium diphtheriae* infections currently and in the past. *Przegląd Epidemiologiczny*. 2015;69(3):439–444.

11. Mattos-Guaraldi AL, Moreira LO, Damasco PV, Hirata R. Diphtheria remains a threat to health in the developing world—an overview. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98(8):987–993. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000800001>

12. Zasada AA. Nontoxigenic highly pathogenic clone of *Corynebacterium diphtheriae*, Poland, 2004–2012. *Emerging Infectious Diseases*. 2013;19(11):1870–1872. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130297>

13. Kolodkina V, Titov L, Sharapa T, Grimont F, Grimont PAD, Efstratiou A. Molecular epidemiology of *C. diphtheriae* strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus. *BMC Infectious Diseases*. 2006;6:129–137. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-129>

14. Sharma NC, Efstratiou A, Mokrousov I, Mutreja A, Das B, Ramamurthy T. Diphtheria. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019;5(1):81. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0131-y>

15. Paveenkittiporn W, Sripakdee S, Koobkratok O, Sangkitporn S, Kerdsin A. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of outbreak-associated *Corynebacterium diphtheriae* in Thailand, 2012. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019;75:104007. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104007>

16. Kneen R, Pham NG, Solomon T, Tran TM, Nguyen TT, Tran BL, et al. Penicillin vs. erythromycin in the treatment of diphtheria. *Clinical Infectious Diseases*. 1998;27(4):845–850. <https://doi.org/10.1086/514959>

17. Pereira GA, Pimenta FP, Wink dos Santos FR, Damasco PV, Hirata R, Mattos-Guaraldi AL. Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(5):507–510. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762008000500019>

18. Husada D, Soegianto SDP, Kurniawati IS, Hendrata AP, Irawan E, Kartina L, et al. First-line antibiotic susceptibility pattern of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Indonesia. *BMC Infectious Diseases*. 2019;19(1):1049. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4675-y>

19. Hennart M, Panunzi LG, Rodrigues C, Gaday Qu, Baines SL, Barros-Pinkelng M, et al. Population genomics and antimicrobial resistance in

Corynebacterium diphtheria. *Genome Medicine*. 2020;12(1):107. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00805-7>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Степаненко Лилия Александровна,
к.м.н., старший научный сотрудник
лаборатории молекулярной вирусологии
и биотехнологии,
НИИ биомедицинских технологий,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: steplia@mail.ru

Джиоев Юрий Павлович,
к.б.н., заведующий лабораторией
молекулярной вирусологии и биотехнологии,
НИИ биомедицинских технологий,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
e-mail: alanir07@mail.ru

Злобин Владимир Игоревич,
д.м.н., академик РАН,
заведующий кафедрой микробиологии,
вирусологии и иммунологии,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
Российская Федерация,
e-mail: vizlobin@mail.ru

Борисенко Андрей Юрьевич,
ассистент кафедры микробиологии,
вирусологии и иммунологии,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
e-mail: 89500720225@mail.ru

Саловарова Валентина Петровна,
д.б.н., профессор, заведующая кафедрой
физико-химической биологии,
Иркутский государственный университет,
664011, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5,
Российская Федерация,
e-mail: vsalovarova@gmail.com

Арефьева Надежда Александровна,
студентка,
Иркутский государственный университет,
664011, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5,
Российская Федерация,
e-mail: arefieva.n4@gmail.com

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Lilia A. Stepanenko,
Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher,
Laboratory of Molecular Virology
and Biotechnology,
Research Institute of Biomedical Technologies,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
✉ e-mail: steplia@mail.ru

Yuri P. Dzhioev,
Cand. Sci. (Biology), Head of the Laboratory
of Molecular Virology and Biotechnology,
Research Institute of Biomedical Technologies,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation?
e-mail: alanir07@mail.ru

Vladimir I. Zlobin,
Dr. Sci. (Medicine), Academician of RAS,
Head of the Department of Microbiology,
Virology and Immunology,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: vizlobin@mail.ru

Andrey Yu. Borisenko,
Postgraduate, Teaching Assistant,
Department of Microbiology, Virology
and Immunology,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: 89500720225@mail.ru

Valentina P. Salovarova,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Head of the Department of Physical
and Chemical Biology,
Irkutsk State University,
5, Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664011,
Russian Federation,
e-mail: vsalovarova@gmail.com

Nadezhda A. Arefieva,
Student,
Irkutsk State University,
5, Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664011,
Russian Federation,
e-mail: arefieva.n4@gmail.com

Семинский Игорь Жанович,
д.м.н., профессор, заведующий кафедрой
паталогической физиологии
и клинической лабораторной диагностики,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
e-mail: i.seminskiy@ismu.baikal.ru

Малов Игорь Владимирович,
д.м.н., профессор, ректор, заведующий
кафедрой инфекционных болезней,
Иркутский государственный медицинский
университет,
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1,
e-mail: i.malov@ismu.baikal.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 16.12.2020.
Одобрена после рецензирования 18.02.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.*

Igor Zh. Seminsky,
Dr. Sci. (Medicine), Professor,
Head of the Department of Pathological
Physiology
and Clinical Laboratory Diagnostics,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: i.seminskiy@ismu.baikal.ru

Igor V. Malov,
Dr. Sci. (Medicine), Professor, Rector,
Head of the Department of Infectious Diseases,
Irkutsk State Medical University,
1, Krasnogo Vosstaniya St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: i.malov@ismu.baikal.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

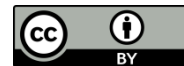
*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 16.12.2020.
Approved after reviewing 18.02.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 504.054; 631.8

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-228-235>



Влияние гумусовых кислот низинного торфа на ремедиационные свойства растений пшеницы при комплексном загрязнении тяжелыми металлами

© Т.А. Кирдей

Ивановская государственная сельскохозяйственная академия им. Д.К. Беляева,
г. Иваново, Российская Федерация

Резюме: Фиторемедиация является перспективной технологией очистки почвы и воды от тяжелых металлов. Несмотря на свидетельства повышения накопления тяжелых металлов культурными растениями под влиянием природных комплексообразователей – гумусовых кислот, их эффективность в фиторемедиации остается малоизученной. В связи с этим целью настоящей работы состояла в выяснении особенностей влияния препарата гумусовых кислот торфа на ремедиационный потенциал растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при комплексном загрязнении тяжелыми металлами. Влияние полиметаллического загрязнения на ремедиационные свойства пшеницы изучали в модельных вегетационных экспериментах с использованием водной культуры. Растения выращивали на питательном растворе Хогланда. Комплексное действие тяжелых металлов создавали при использовании 10 мкмоль/л $CdSO_4$, 25 и 50 мкмоль/л $CuSO_4$, 500 и 1000 мкмоль/л $Pb(NO_3)_2$ в различных сочетаниях с добавлением препарата гумусовых кислот торфа (0,005%) или без него. Фиторемедиационную эффективность препарата гумусовых кислот определяли по выносу тяжелых металлов в фазу колошения пшеницы. В результате исследований установлено, что фиторемедиационная эффективность препарата гумусовых кислот определяется как усилением поглощения тяжелых металлов, так и снижением их токсического действия на растения. При комплексном загрязнении раствора тяжелыми металлами, которое характеризовалось высокой токсичностью, в вариантах с добавлением гумусовых кислот накопление растениями пшеницы меди и кадмия повысилось в 1,2–2,5 раза. Данные свидетельствуют о возможности использования препарата гумусовых кислот торфа в фиторемедиационных технологиях в качестве фактора фитоэкстракции тяжелых металлов.

Ключевые слова: пшеница, гумусовые кислоты, тяжелые металлы, свинец, кадмий, медь, фиторемедиация

Для цитирования: Кирдей Т.А. Влияние гумусовых кислот низинного торфа на ремедиационные свойства растений пшеницы при комплексном загрязнении тяжелыми металлами. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 2. С. 228–235. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-228-235>

Influence of humic acids in lowland peat on the remediation properties of wheat plants against heavy metal contamination

Tatiana A. Kirdey

Ivanovo State Agricultural Academy by D.K. Belyaev,
Ivanovo, Russian Federation

Abstract: Phytoremediation is a promising technology for removing heavy metals from soil and water. Despite the pronounced increase in heavy metal accumulation by cultivated plants under the influence of naturally occurring complexing agents, such as humic acids, their efficiency in phytoremediation has been poorly studied. In this regard, the aim of this work is to elucidate the effect of peat humic acid formulations on the remediation potential of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) against heavy metal contamination. The influence of polymetallic pollution on the remediation properties of wheat was studied in model vegetation experiments using a culture solution. Plants were grown in a Hoagland nutrient solution. A complex exposure to heavy metals was simulated using 10 $\mu\text{mol/L}$ $CdSO_4$, 25 and 50 $\mu\text{mol/L}$ $CuSO_4$, 500 and 1000 $\mu\text{mol/L}$ $Pb(NO_3)_2$ in various combinations with or without the addition of a peat humic acid formulation (0.005%).

The phytoremediation efficiency of the humic acid formulation was determined by the removal of heavy metals during the heading stage of wheat growth. The research results showed that the phytoremediation efficiency of the humic acid formulation is defined by both an increase in the absorption of heavy metals and a decrease in their toxic action on the plants. In the case of mixed contamination of the solution with highly toxic heavy metals, the samples with humic acids showed a 1.2–2.5-fold increase in the accumulation of copper and cadmium by wheat plants. The data demonstrates the possibility of using the formulation of peat humic acids in phytoremediation technologies as an effector of heavy metal phytoextraction.

Keywords: wheat, humic acids, heavy metals, lead, cadmium, copper, phytoremediation

For citation: Kirdey TA. Influence of humic acids in lowland peat on the remediation properties of wheat plants against heavy metal contamination. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):228–235. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-228-235>

ВВЕДЕНИЕ

Химическое загрязнение окружающей среды, вызванное ростом производства различных химических соединений, развитием промышленности и транспорта, отсутствием эффективных систем очистки выбросов, использованием устаревшего оборудования и несовершенных технологий, приводит к нарушению сбалансированного, устойчивого существования экосистем, снижению их продуктивности, видового разнообразия, что является мощным фактором разрушения биосферы. Тяжелые металлы (ТМ) являются особо опасными загрязнителями, так как проявляют свойства экотоксикантов, обладают высокой токсичностью в небольших концентрациях и кумулятивным эффектом [1, 2]. При этом часто встречается комплексное загрязнение ТМ. Среди наиболее распространенных ТМ выделяются свинец, кадмий, медь [3].

Эффективную очистку почвы и воды от ТМ обеспечивают фиторемедиационные технологии [4–8]. Основными направлениями фиторемедиации являются: фитоэкстракция, включающая поглощение, накопление и удаление загрязняющих ионов; фитофильтрация с использованием проростков; фитодеградация; фитостабилизация и фитоиспарение [9].

Для фитоэкстракции ТМ обычно используют растения, которые называются гипераккумуляторами, так как они накапливают загрязняющие ионы в количестве более 1% сухой надземной массы, что превышает накопление обычными растениями в 100 раз. Но такие растения, как правило, характеризуются невысокой скоростью роста и низкой массой [10]. Культурные растения в основном не являются гипераккумуляторами ТМ, но имеют способность поглощать эти ионы, а также характеризуются интенсивной скоростью накопления биомассы [11]. Растения, которые накапливают загрязняющие ионы преимущественно в корневой системе [5], могут, очевидно, найти применение в технологиях ризофильтрации [12].

С целью усиления накопления ТМ растениями

применяют синтетические хелаторы, например, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) [13], что небезопасно для живых организмов и окружающей среды. Несмотря на свидетельства повышения накопления растениями тяжелых металлов под влиянием природных комплексообразователей – гумусовых кислот [14–16], их эффективность в фиторемедиации остается малоисследованной. Перспективными являются препараты гумусовых кислот торфа в связи со значительными запасами этого возобновляемого природного ресурса [17].

В связи с этим цель работы заключалась в изучении особенностей влияния препарата гумусовых кислот торфа на ремедиационные свойства растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в условиях комплексного загрязнения тяжелыми металлами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследованиях использовали препарат гумусовых кислот (ГФК), полученный из низинного торфа [18]. Гумусовые кислоты торфа характеризуются высокой окислительно-восстановительной, поверхностной, антиоксидантной активностью¹. В качестве объекта исследований выбрана яровая пшеница (*Triticum aestivum* L.; сорт Приокская) как представитель культурных растений – «исключателей» токсичных ионов [5].

Исследования включали вегетационные эксперименты с использованием водной культуры. Семена проращивали на растворах солей ТМ (10 мкмоль/л CdSO_4 , 25 и 50 мкмоль/л CuSO_4 , 500 и 1000 мкмоль/л $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) с добавлением препарата гумусовых кислот (0,01%) или без него в соответствии со схемой опыта (табл. 1).

Концентрации солей ТМ выбраны по результатам предшествующих экспериментов как не вызывающие гибель растений в течение вегетации. Затем 7-дневные проростки высаживали на 1-литровые сосуды (по 4 растения) с питательным раствором Хогланда (1/4 нормы) [19] с добавлением солей ТМ и ГФК (0,005%) в соответствии со схемой опыта. Для приготовления

¹Перминова И.В. Анализ, классификация и прогноз свойств гуминовых кислот: дис. ... д-ра хим. наук: 02.00.02. Москва, 2000. 360 с.

Таблица 1. Сухая масса побегов (г/растение)

Table 1. Shoots dry mass (g per plant)

| Вариант | Кущение | Трубкавание | Колошение |
|--|------------------|-------------------|------------------|
| 1. Контроль | 0,96±0,08 | 3,57±0,06 | 7,10±0,10 |
| 2. ГФК | 1,27±0,08 | 4,10±0,010 | 8,35±0,06 |
| 3. CdSO ₄ 10 мкмоль/л | 0,45±0,06 | 2,52±0,05 | 4,05±0,15 |
| 4. CdSO ₄ 10мкмоль/л + ГФК | 0,54±0,03 | 2,86±0,06 | 4,80±0,05 |
| 5. CuSO ₄ 25 мкмоль/л | 0,51±0,03 | 1,12±0,07 | 1,63±0,05 |
| 6. CuSO ₄ 25 мкмоль/л + ГФК | 0,80±0,04 | 1,70±0,13 | 2,10±0,11 |
| 7. CuSO ₄ 50 мкмоль/л | 0,28±0,03 | 0,66±0,05 | 0,90±0,14 |
| 8. CuSO ₄ 50 мкмоль/л + ГФК | 0,41±0,04 | 0,85±0,04 | 1,30±0,10 |
| 9. Pb(NO ₃) ₂ 500 мкмоль/л | 0,55±0,08 | 2,36±0,06 | 4,20±0,08 |
| 10. Pb(NO ₃) ₂ 500 мкмоль/л + ГФК | 0,70±0,04 | 2,50±0,02 | 4,90±0,18 |
| 11. Pb(NO ₃) ₂ 1000 мкмоль/л | 0,49±0,05 | 1,29±0,05 | 3,37±0,05 |
| 12. Pb(NO ₃) ₂ 1000 мкмоль/л + ГФК | 0,47±0,03 | 1,42±0,09 | 3,70±0,05 |
| 13. Pb(NO ₃) ₂ 500 + CdSO ₄ 10 мкмоль/л | 0,20±0,04 | 0,61±0,09 | 0,92±0,09 |
| 14. Pb(NO ₃) ₂ 500+CdSO ₄ 10 мкмоль/л + ГФК | 0,22±0,02 | 0,74±0,04 | 1,30±0,07 |
| 15. Pb(NO ₃) ₂ 1000+CdSO ₄ 10 мкмоль/л | 0,08±0,02 | 0,32±0,09 | 0,56±0,06 |
| 16. Pb(NO ₃) ₂ 1000+CdSO ₄ 10 мкмоль/л + ГФК | 0,11±0,04 | 0,47±0,05 | 0,84±0,04 |
| 17. Pb(NO ₃) ₂ 500+CuSO ₄ 25 мкмоль/л | 0,20±0,03 | 0,27±0,04 | 0,34±0,04 |
| 18. Pb(NO ₃) ₂ 500+CuSO ₄ 25 мкмоль/л + ГФК | 0,35±0,04 | 0,38±0,04 | 0,42±0,06 |
| 19. Pb(NO ₃) ₂ 1000 + CuSO ₄ 50 мкмоль/л | 0,15±0,04 | 0,16±0,03 | 0,17±0,04 |
| 20. Pb(NO ₃) ₂ 1000 + CuSO ₄ 50 мкмоль/л + ГФК | 0,20±0,03 | 0,22±0,03 | 0,24±0,04 |
| 21. CdSO ₄ 10+CuSO ₄ 25 +Pb(NO ₃) ₂ 500 мкмоль/л | 0,05±0,00 | 0,08±0,04 | 0,10±0,03 |
| 22. CdSO ₄ 10+CuSO ₄ 25 +Pb(NO ₃) ₂ 500 мкмоль/л + ГФК | 0,05±0,01 | 0,09±0,02 | 0,11±0,00 |
| 23. CdSO ₄ 10+CuSO ₄ 50 +Pb(NO ₃) ₂ 1000 мкмоль/л | 0,02±0,00 | 0,03±0,01 | 0,06±0,02 |
| 24. CdSO ₄ 10+CuSO ₄ 50 +Pb(NO ₃) ₂ 1000 мкмоль/л + ГФК | 0,03±0,01 | 0,04±0,02 | 0,10±0,02 |

Примечание. Приведены средние значения и их стандартные отклонения; жирным шрифтом выделено статистически значимое влияние ГФК при $p < 0,01$.

раствора использовали химически чистые соли и водопроводную воду. Контрольные растения выращивали на питательном растворе без ТМ и ГФК. Норму питательной смеси увеличивали в соответствии с ростом растений до 1/2 и полной нормы. Смену раствора производили каждые 7 дней. Пробы растений отбирали по фазам развития контрольных растений – в фазе кущения убирала по два растения с сосуда, в фазах трубкавания и колошения – по одному. Повторность в опыте – 4-х кратная. Определяли сырую и сухую массу побегов и корней растений. Содержание ТМ в тканях растений анализировали на атомно-абсорбционном спектрометре Shimadzu-680.

За коэффициент взаимодействия ТМ принимали отношение их содержания (мг/кг сухой массы) при комплексном действии к содержанию при отдельном применении.

При расчете коэффициента фиторемедиационной эффективности ГФК определяли соотношение выноса ТМ растениями (мг/растение), выращенными в присутствии ГФК и без ГФК.

При статистической обработке результатов применяли ранговый дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При комплексном действии свинца и меди, свинца и кадмия, а также всех изучаемых ТМ наблюдалось усиление их токсичности по сравнению с отдельным действием (рисунок, см. табл. 1).



Внешний вид растений при отдельном и комплексном действии кадмия и свинца на растения пшеницы: слева направо – 10 мкМ CdSO₄; 1000 мкМ Pb(NO₃)₂; 10 мкМ CdSO₄+1000 мкМ Pb(NO₃)₂ (в двух сосудах)

Wheat plant appearance under separate and complex cadmium and lead action: from left to right – 10 mcmol CdSO₄; 1000 mcmol Pb(NO₃)₂; 10 mcmol CdSO₄+1000 mcmol Pb(NO₃)₂ (two vessels)

Токсичность тяжелых металлов оценивали по снижению массы побегов растений относительно контроля. Наиболее токсичным оказалось комплексное действие меди, кадмия и свинца: растения фактически оставались на стадии проростков до фазы колошения контрольных растений. Масса опытных растений была ниже контрольных более чем в 100 раз (см. табл. 1). При

комплексном действии кадмия и свинца масса опытных растений снизилась в 5–12 раз, при действии меди и свинца – в 5–40 раз по сравнению с контрольными растениями. Совместное действие свинца и меди на момент уборки опыта оказалось примерно в 3 раза более токсичным, чем свинца и кадмия.

Препарат ГФК торфа снизил фитотоксичность кадмия на 13–19%, меди – на 29–52%, свинца – на 6–16%. Протекторное действие ГФК при комплексном действии ТМ оказалось слабее, чем при раздельном: к моменту уборки опыта эффективность ГФК доказана статистически только при совместном действии 500 мкмоль $Pb(NO_3)_2$ и 10 мкмоль $CdSO_4$ (биомасса растений повысилась в 1,4 раза относительно варианта без ГФК). По-видимому, защитное действие ГФК снижено в связи с высокой токсичностью смесей ТМ. Тем не менее протекторное действие ГФК может иметь значение в фиторемедиационных технологиях, так как снижение токсичности ТМ приводит к увеличению их выноса.

Значения коэффициента взаимодействия ТМ свидетельствуют об усилении поглощения ТМ при их совместном действии (табл. 2). Причем практически во всех вариантах комплексного применения ТМ в наибольшей степени увеличилось содержание свинца в побегах растений (в 5–34 раза) по сравнению с раздельным действием.

Ремедиационный потенциал растений определяется их способностью удалять (выносить) поллютанты из среды роста (табл. 3).

Очевидно, что снижение ремедиационной способности растений при комплексном действии ТМ по сравнению с раздельным обусловлено усилением токсичности. Высокая токсичность приводит к снижению массы и, соответственно, к снижению выноса ТМ. Например, вынос кадмия побегами растений пшеницы при комплексном действии $Pb(NO_3)_2$ и $CdSO_4$ оказался на порядок ниже выноса при их раздельном действии, хотя содержание элемента в растении

(мг/кг сухой массы) увеличилось при комплексном действии в 3–5 раз по сравнению с раздельным. Вынос меди побегами растений также существенно снизился при комплексном действии 1000 мкмоль $Pb(NO_3)_2$ и 50 мкмоль $CuSO_4$ – в 38 раз по сравнению с раздельным. Вынос свинца при комплексном действии 500 мкмоль $Pb(NO_3)_2$ и 10 мкмоль $CdSO_4$ или 25 мкмоль $CuSO_4$ снизился в 4,7 и в 1,7 раз соответственно. Самый низкий вынос ТМ наблюдался при действии самой токсичной смеси – смеси солей меди, кадмия и свинца.

Вынос ТМ корневой системой растений пшеницы может иметь значение для фиторемедиационных технологий, предусматривающих удаление корневой системы с последующей утилизацией или извлечением ТМ. При комплексном действии ТМ вынос кадмия корневой системой пшеницы был выше в 3–7 раз, меди – в 5–7 раз, свинца – в 9–84 раза по сравнению с побегами. При комплексном действии нитрата свинца и солей кадмия или меди вынос кадмия корнями растений был ниже в 1,5–1,7 раз, меди – в 4–7,7 раза по сравнению с раздельным действием.

Таким образом, при комплексном загрязнении ТМ ремедиационная способность растений пшеницы снижается в связи с усилением токсичности смеси ТМ.

В присутствии ГФК вынос меди побегами растений пшеницы увеличился в 1,4 раза при 25 мкмоль $CuSO_4$, в 1,3 раза – при комплексном действии 50 мкмоль $CuSO_4$ и 1000 мкмоль $Pb(NO_3)_2$, и в 2,3 раза – при комплексном действии солей меди, кадмия и свинца (табл. 4). Препарат ГФК повысил вынос кадмия побегами растений в 1,2–1,8 раза при комплексном действии $CdSO_4$ и $Pb(NO_3)_2$ и в 2,5 раза – в присутствии солей меди, кадмия и свинца. Существенный эффект ГФК в отношении накопления свинца побегами растений наблюдался при 1000 мкмоль $Pb(NO_3)_2$ – вынос увеличился почти в 7 раз.

Таблица 2. Коэффициент взаимодействия тяжелых металлов

Table 2. Heavy metals interaction coefficient

| Вариант | Побеги | | | Корни | | |
|---|--------|------|-------|-------|------|-------|
| | Cu | Cd | Pb | Cu | Cd | Pb |
| 13. $Pb(NO_3)_2$ 500 + $CdSO_4$ 10 мкмоль/л | – | 3,24 | 0,83 | - | 2,5 | 27,5 |
| 14. $Pb(NO_3)_2$ 500 + $CdSO_4$ 10 мкмоль/л + ГФК | – | 5,61 | 0,68 | – | 5,67 | 9,63 |
| 15. $Pb(NO_3)_2$ 1000 + $CdSO_4$ 10 мкмоль/л | – | 5,54 | 16,40 | – | 4,32 | 3,19 |
| 16. $Pb(NO_3)_2$ 1000 + $CdSO_4$ 10 мкмоль/л + ГФК | – | 5,30 | 0,59 | – | 5,41 | 5,11 |
| 17. $Pb(NO_3)_2$ 500 + $CuSO_4$ 25 мкмоль/л | 2,81 | – | 5,20 | 1,18 | – | 29,05 |
| 18. $Pb(NO_3)_2$ 500 + $CuSO_4$ 25 мкмоль/л + ГФК | 1,38 | – | 2,19 | 0,68 | – | 5,97 |
| 19. $Pb(NO_3)_2$ 1000 + $CuSO_4$ 50 мкмоль/л | 0,11 | – | 34,4 | 1,48 | – | 0,82 |
| 20. $Pb(NO_3)_2$ 1000 + $CuSO_4$ 50 мкмоль/л + ГФК | 1,30 | - | 1,47 | 1,12 | – | 3,52 |
| 21. $CdSO_4$ 10 + $CuSO_4$ 25 + $Pb(NO_3)_2$ 500 мкмоль/л | 1,28 | 3,78 | 5,20 | – | – | – |
| 22. $CdSO_4$ 10 + $CuSO_4$ 25 + $Pb(NO_3)_2$ 500 мкмоль/л + ГФК | 2,59 | 7,88 | 0,66 | – | – | – |

Таблица 3. Вынос ТМ растениями пшеницы в фазу колошения (мг/растение)

Table 3. Heavy metals accumulation by wheat plants in earing phase (mg per plant)

| Вариант | Cu | Cd | Pb |
|--|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. Контроль | 0,001±0,001/ 0,141±0,013 | 0,005±0,001/ 0,001±0,000 | 0,518±0,027/ 0,097±0,008 |
| 2. ГФК | 0,002±0,001/ 0,221±0,016 | 0,003±0,000/ 0,003±0,000 | 0,710±0,012/ 0,140±0,009 |
| 3. CdSO ₄ 10 мкмоль/л | – | 0,102±0,006/ 0,133±0,011 | – |
| 4. CdSO ₄ 10 мкмоль/л + ГФК | – | 0,018±0,002/ 0,100±0,010 | – |
| 5. CuSO ₄ 25 мкмоль/л | 0,031±0,003/ 0,349±0,028 | – | – |
| 6. CuSO ₄ 25 мкмоль/л + ГФК | 0,043±0,003/ 0,626±0,005 | – | – |
| 7. CuSO ₄ 50 мкмоль/л | 0,528±0,010/ 0,383±0,016 | – | – |
| 8. CuSO ₄ 50 мкмоль/л + ГФК | 0,054±0,005/ 0,625±0,048 | – | – |
| 9. Pb(NO ₃) ₂ 500 мкмоль/л | –* | – | 0,236±0,012/ 0,222±0,079 |
| 10. Pb(NO ₃) ₂ 500 мкмоль/л + ГФК | – | – | 0,182±0,012/ 1,661±0,063 |
| 11. Pb(NO ₃) ₂ 1000 мкмоль/л | – | – | 0,032±0,003/ 8,404±0,733 |
| 12. Pb(NO ₃) ₂ 1000 мкмоль/л + ГФК | – | – | 0,213±0,011/ 1,266±0,056 |
| 13. Pb(NO ₃) ₂ 500 + CdSO ₄ 10 мкмоль/л | – | 0,015±0,002/ /0,077±0,006 | 0,051±0,008/ 2,849±0,086 |
| 14. Pb(NO ₃) ₂ 500 + CdSO ₄ 10 мкмоль/л + ГФК | – | 0,027±0,002/ 0,115±0,035 | 0,037±0,006/ 1,820±0,051 |
| 15. Pb(NO ₃) ₂ 1000 + CdSO ₄ 10 мкмоль/л | – | 0,013±0,002/ 0,086±0,003 | 0,131±0,016/ 10,980±1,324 |
| 16. Pb(NO ₃) ₂ 1000 + CdSO ₄ 10 мкмоль/л + ГФК | – | 0,016±0,001/ 0,080±0,004 | 0,041±0,004/ 2,541±0,553 |
| 17. Pb(NO ₃) ₂ 500 + CuSO ₄ 25 мкмоль/л | 0,024±0,004/ 0,087±0,006 | – | 0,140±0,014/ 2,150±0,087 |
| 18. Pb(NO ₃) ₂ 500 + CuSO ₄ 25 мкмоль/л + ГФК | 0,015±0,001/ 0,069±0,003 | – | 0,061±0,011/ 0,827±0,042 |
| 19. Pb(NO ₃) ₂ 1000 + CuSO ₄ 50 мкмоль/л | 0,014±0,001/ 0,050±0,002 | – | 0,138±0,009/ 1,256±0,090 |
| 20. Pb(NO ₃) ₂ 1000 + CuSO ₄ 50 мкмоль/л + ГФК | 0,018±0,001/ 0,053±0,003 | – | 0,048±0,007/ 0,636±0,041 |
| 21. CdSO ₄ 10 + CuSO ₄ 25 + Pb(NO ₃) ₂ 500 мкмоль/л | 0,003±0,000/ – | 0,002±0,000/ – | 0,042±0,006/ – |
| 22. CdSO ₄ 10 + CuSO ₄ 25 + Pb(NO ₃) ₂ 500 мкмоль/л + ГФК | 0,007±0,001/ – | 0,005±0,001/ – | 0,004±0,001/ – |

Примечание. В числителе – побеги, в знаменателе – корни. Приведены средние значения и их стандартные отклонения. Жирным шрифтом выделено статистически значимое влияние ГФК при $p < 0,01$.

Вынос меди корневой системой растений пшеницы в присутствии ГФК увеличился в 1,6 и 1,8 раза при 50 и 25 мкмоль CuSO₄ соответственно, кадмия – в 1,5 раза при комплексном действии 500 мкмоль Pb(NO₃)₂ и 10 мкмоль CdSO₄.

Таким образом, проявление фиторемедиационной эффективности ГФК неоднозначно и зависит от многих факторов. По-видимому, более высокая фиторемедиационная эффективность ГФК проявляется при меньшей токсично-

сти ТМ. Важно учитывать, что фиторемедиационная эффективность ГФК определяется как усилением поглощения ТМ, так и снижением их токсического действия на растения. При полиметаллическом загрязнении, которое характеризуется высокой токсичностью, препарат гумусовых кислот торфа повысил фиторемедиационный потенциал побегов пшеницы в отношении меди в 1,3–2,3 раза, кадмия – в 1,2–2,5 раза, и снизил примерно в 3 раза в отношении свинца.

Таблица 4. Коэффициент фиторемедиационной эффективности ГФК

Table 4. HFA phytoremediation efficacy coefficient

| Вариант | Cu | Cd | Pb |
|---|------------------|------------------|------------------|
| Побеги | | | |
| 4. CdSO ₄ 10 мкмоль/л + ГФК | – | 0,18±0,01 | – |
| 6. CuSO ₄ 25 мкмоль/л + ГФК | 1,36±0,04 | – | – |
| 8. CuSO ₄ 50 мкмоль/л + ГФК | 0,10±0,01 | – | – |
| 10. Pb(NO ₃) ₂ 500 мкмоль/л + ГФК | – | – | 0,77±0,01 |
| 12. Pb(NO ₃) ₂ 1000 мкмоль/л + ГФК | – | – | 6,66±1,23 |
| 14. Pb(NO ₃) ₂ 500 + CdSO ₄ 10 мкмоль/л + ГФК | – | 1,80±0,25 | 0,73±0,05 |
| 16. Pb(NO ₃) ₂ 1000 + CdSO ₄ 10 мкмоль/л + ГФК | – | 1,23±0,30 | 0,31±0,02 |
| 18. Pb(NO ₃) ₂ 500 + CuSO ₄ 25 мкмоль/л + ГФК | 0,62±0,06 | – | 0,44±0,01 |
| 20. Pb(NO ₃) ₂ 1000 + CuSO ₄ 50 мкмоль/л + ГФК | 1,29±0,04 | – | 0,35±0,04 |
| 22. CdSO ₄ 10 + CuSO ₄ 25 +Pb(NO ₃) ₂ 500 мкмоль/л + ГФК | 2,33±0,12 | 2,50±0,19 | 0,10±0,01 |
| Корни | | | |
| 4. CdSO ₄ 10 мкмоль/л + ГФК | – | 0,75±0,00 | – |
| 6. CuSO ₄ 25 мкмоль/л + ГФК | 1,79±0,06 | – | – |
| 8. CuSO ₄ 50 мкмоль/л + ГФК | 1,63±0,12 | – | – |
| 10. Pb(NO ₃) ₂ 500 мкмоль/л + ГФК | – | – | 7,48±0,01 |
| 12. Pb(NO ₃) ₂ 1000 мкмоль/л + ГФК | – | – | 0,15±0,00 |
| 14. Pb(NO ₃) ₂ 500 + CdSO ₄ 10 мкмоль/л + ГФК | – | 1,49±0,00 | 0,64±0,01 |
| 16. Pb(NO ₃) ₂ 1000 + CdSO ₄ 10 мкмоль/л + ГФК | – | 0,93±0,03 | 0,23±0,00 |
| 18. Pb(NO ₃) ₂ 500 + CuSO ₄ 25 мкмоль/л + ГФК | 0,79±0,03 | – | 0,38±0,01 |
| 20. Pb(NO ₃) ₂ 1000 + CuSO ₄ 50 мкмоль/л + ГФК | 1,06±0,07 | – | 0,51±0,01 |
| 22. CdSO ₄ 10 + CuSO ₄ 25 +Pb(NO ₃) ₂ 500 мкмоль/л + ГФК | 1,06 | –* | 0,51 |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При комплексном действии тяжелых металлов значительно усиливается их токсичность, что может снизить эффективность фиторемедиационных технологий. Более высокая токсичность комплексного действия ТМ обусловлена, по-видимому, более интенсивным поступлением ТМ в побеги пшеницы. Вынос ТМ при их комплексном действии снизился по сравнению с отдельным.

Как показали исследования, фиторемедиационная эффективность гумусовых кислот низинного торфа неоднозначна и определяется как

усилением поглощения тяжелых металлов, так и снижением их токсического действия на растения. Препарат гумусовых кислот торфа, проявляя фитопротекторные свойства и снижая токсичность ТМ, повышает тем самым их вынос растениями. При полиметаллическом загрязнении в варианте с ГФК накопление растениями пшеницы меди и кадмия повысилось в 1,2–2,5 раза, что свидетельствует о возможности использования препарата гумусовых кислот торфа в фиторемедиационных технологиях в качестве фактора фитоэкстракции тяжелых металлов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lyanguzova I.V. Dynamic trends of heavy metal contents in plants and soil under different industrial air pollution regimes // Russian Journal of Ecology. 2017. Vol. 48. Issue 4. P. 311–320. <https://doi.org/10.1134/S1067413617040117>
2. Гиниятуллин Р.Х., Бактыбаева З.Б. Особенности накопления Cd и Ni листовыми частями Сукчаева (Larix sukaczewii Dyl.) в условиях техногенеза // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2020. N 51. С. 141–161. <https://doi.org/10.17223/19988591/51/8>
3. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях / пер. с англ. Д.В. Гричука, Е.П. Янина; под ред. Ю.Е. Саета. М.: Мир, 1989. 439 с.
4. Prasad M.N.V. Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: hype for commercialization // Russian Journal of Plant Physiology. 2003. Vol. 50. Issue 5. P. 686–701. <https://doi.org/10.1023/A:1025604627496>
5. Baker A.J.M. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals // Journal of Plant Nutrition. 1981. Vol. 3. Issue 1-4. P. 643–654. <https://doi.org/10.1080/01904168109362867>
6. Pilon-Smits E. Phytoremediation // Annual Review of Plant Biology. 2005. Vol. 56. P. 15–39. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214>
7. Prieto M.J., Acevedo SOA, Prieto G.F., Nallely T.G. Phytoremediation of soils contaminated with heavy metals // Biodiversity International Journal. 2018. Vol. 2. Issue 4. P. 362–376. <https://doi.org/10.15406/bij.2018.02.00088>
8. Yan A., Wang Y., Tan S.N., Mohd Yusof M.L., Ghosh S., Chen Z. Phytoremediation: A promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land // Frontiers in Plant Science. 2020. Vol. 11. P. 359. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>
9. Evangelou M.W.H., Robinson B.H., Günthardt-Goerg M.S., Schulin R. Metal uptake and allocation in trees grown on contaminated land: implications for biomass production // International Journal of Phytoremediation. 2012. Vol. 15. Issue 1. P. 77–90. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.670317>

10. Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants // *Biotechnology*. 1995. Vol. 13. Issue 5. P. 468–475. <https://doi.org/10.1038/nbt0595-468>
11. Vamerali T., Bandiera M., Mosca G. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review // *Environmental Chemistry Letters*. 2010. Vol. 8. Issue 1. P. 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10311-009-0268-0>
12. Lee M., Yang M. Rhizofiltration using sunflower (*Helianthus annuus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*) to remediate uranium contaminated groundwater // *Journal of Hazardous Materials*. 2010. Vol. 173. Issue 1-3. P. 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.jhaz-mat.2009.08.127>
13. Jensen J.K., Holm P.E., Nejrup J., Borggaard O.K. A laboratory assessment of potentials and limitations of using EDTA, rhamnolipids, and compost-derived humic substances (HS) in enhanced phytoextraction of copper and zinc polluted calcareous soils // *Soil and Sediment Contamination: an International Journal*. 2011. Vol. 20. Issue 7. P. 777–789. <https://doi.org/10.1080/15320383.2011.609198>
14. Halim M., Conte P., Piccolo A. Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances // *Chemosphere*. 2003. Vol. 52. Issue 1. P. 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00185-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00185-1)
15. Evangelou M.W.H., Daghan H., Schaeffer A. The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil // *Chemosphere*. 2004. Vol. 57. Issue 3. P. 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.017>
16. Кирдей Т.А. Влияние гумата на фиторемедиационные свойства пшеницы при возрастающих концентрациях нитрата свинца // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2017. Т. 7. N 4. С. 110–115. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-4-110-115>
17. Чураков А.А. Запасы торфа в России // *Лесной вестник*. 2003. N 3. С. 22–25.
18. Пат. № 2310633, Российская Федерация. Способ получения жидких торфяных гуматов / Ю.А. Калинин, И.Ю. Вашурина, Т.А. Кирдей; патентообладатель ООО «Научно-производственная фирма “Недра”»; заявл. 15.06.2006; опубл. 20.11.2007. Бюл. № 32. 4 с.
19. Hoagland DR, Arnon DE. The water-culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station. 1950. Available from: <https://ia800306.us.archive.org/6/items/watercultureme3450hoag/watercultureme3450hoag.pdf> [Accessed 25th November 2020].

REFERENCES

1. Lyanguzova IV. Dynamic trends of heavy metal contents in plants and soil under different industrial air pollution regimes. *Russian Journal of Ecology*. 2017;48(4):311–320. <https://doi.org/10.1134/S1067413617040117>
2. Giniyatullin RH, Baktybaeva ZB. Features of Cd and Ni accumulation by *Larix sukaczewii* Dyl. under technogenesis. *Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2020;51:141–161. (In Russian) <https://doi.org/10.17223/19988591/51/8>
3. Kabata-Pendias A, Pendias Kh. *Trace elements in soils and plants*. Moscow: Mir; 1989, 439 p. (in Russian)
4. Prasad MNV. Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: hype for commercialization. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2003;50(5): 686–701. <https://doi.org/10.1023/A:1025604627496>
5. Baker AJM. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*. 1981;3(1-4):643–654. <https://doi.org/10.1080/01904168109362867>
6. Pilon-Smits E. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*. 2005;56:15–39. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214>
7. Prieto MJ, Acevedo SOA, Prieto GF, Nallely TG. Phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Biodiversity International Journal*. 2018;2(4):362–376. <https://doi.org/10.15406/bij.2018.02.00088>
8. Yan A, Wang Y, Tan SN, Mohd Yusof ML, Ghosh S, Chen Z. Phytoremediation: A promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:359. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>
9. Evangelou MWH, Robinson BH, Günthardt-Goerg MS, Schulin R. Metal uptake and allocation in trees grown on contaminated land: implications for biomass production. *International Journal of Phytoremediation*. 2012;15(1):77–90. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.670317>
10. Salt DE, Blaylock M, Kumar NP, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*. 1995; 13(5):468–475. <https://doi.org/10.1038/nbt0595-468>
11. Vamerali T, Bandiera M, Mosca G. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters*. 2010;8(1):1–17. <https://doi.org/10.1007/s10311-009-0268-0>
12. Lee M, Yang M. Rhizofiltration using sunflower (*Helianthus annuus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*) to remediate uranium contaminated groundwater. *Journal of Hazardous Materials*. 2010;173(1–3):589–596. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.127>
13. Jensen JK, Holm PE, Nejrup J, Borggaard OK. A laboratory assessment of potentials and limitations of using EDTA, rhamnolipids, and compost-

derived humic substances (HS) in enhanced phytoextraction of copper and zinc polluted calcareous soils. *Soil and Sediment Contamination: an International Journal*. 2011;20(7):777–789. <https://doi.org/10.1080/15320383.2011.609198>

14. Halim M, Conte P, Piccolo A. Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. *Chemosphere*. 2003;52(1):265–275. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00185-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00185-1)

15. Evangelou MWH, Daghan H, Schaeffer A. The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil. *Chemosphere*. 2004;57(3):207–213. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.017>

16. Kirdey TA. The influence of humate on the phytoremediation properties of wheat with increasing concentrations of lead nitrate. *Izvestiya Vuzov*.

Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2017;7(4):110–115. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-4-110-115>

17. Churakov AA. Peat reserves in Russia. *Lesnoi vestnik = Forestry bulletin*. 2003;3:22–25. (In Russian)

18. Kalinnikov JA, Vashurina IJ, Kirdej TA. *Method for production of liquid peat humates*. Patene RF, no. 2310633; 2006. (In Russian)

19. Hoagland DR, Arnon DE. The water-culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station. 1950. Available from: <https://ia800306.us.archive.org/6/items/watercultureme3450hoag/watercultureme3450hoag.pdf> [Accessed 25th November 2020].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Кирдей Татьяна Александровна,
к.б.н., доцент кафедры агрономии
и агробизнеса,
Ивановская государственная
сельскохозяйственная академия
им. Д.К. Беляева,
153012, г. Иваново, ул. Советская, 45,
Российская Федерация,
✉ e-mail: t.a.kirdey@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Автор прочел и одобрил окончательный вариант рукописи.

*Поступила в редакцию 27.01.2021.
Одобрена после рецензирования 12.03.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Tatiana A. Kirdey,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Agronomy and Agrobusiness Department,
Ivanovo State Agricultural Academy
by D.K. Belyaev,
45, Sovetskaya St., Ivanovo, 153012,
Russian Federation,
✉ e-mail: t.a.kirdey@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

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

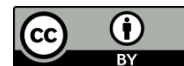
The final manuscript has been read and approved by the author.

*The article was submitted 27.01.2021.
Approved after reviewing 12.03.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 631.812;579.64

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-236-243>



Микробиологическая оценка процесса ускоренной твердофазной ферментации органического сырья

© Н.В. Фомичева*, Г.Ю. Рабинович*,
Е.А. Прутенская**, Ю.Д. Смирнова*

*ФИЦ «Почвенный институт им. В.В. Докучаева», г. Москва, Российская Федерация

**Тверской государственный технический университет, г. Тверь, Российская Федерация

Резюме: Отходы животноводства и птицеводства при рациональном подходе становятся сырьем для производства органических удобрений. Во Всероссийском научно-исследовательском институте мелиорированных земель – филиале ФИЦ «Почвенный институт им. В.В. Докучаева», предложена схема ускоренной твердофазной ферментации навоза крупного рогатого скота с торфом: 48 ч при 37 °С, затем 48 ч при 60 °С, далее 24 ч при 37 °С, завершающаяся естественным остыванием ферментируемой массы. Отличительная черта ускоренной ферментации – искусственное поддержание заданных температур. Цель работы – провести микробиологическую оценку процесса ускоренной твердофазной ферментации. Эксперимент проводили в лабораторном ферментере объемом 1,75 дм³. В процессе ферментации изучали численность микроорганизмов, использующих органические и минеральные формы азота (методом предельных разведений), а также видовую принадлежность микробиоценоза (методом масс-спектрометрии). Результаты исследований показали, что температурный режим основных этапов процесса ферментации обеспечивал максимальную численность мезофильных и термофильных азоттрансформирующих микроорганизмов. Их активное развитие способствовало интенсивной трансформации ферментируемой смеси, о чем свидетельствовали мезофильный и термофильный коэффициенты минерализации. По линейным коэффициентам минерализации в конце процесса судили о завершении процессов трансформации и стабилизации продукта ферментации. Продукт ферментации характеризовался высокой численностью азоттрансформирующих микроорганизмов – в среднем $3,5 \pm 0,3 \cdot 10^8$ КОЕ/г абсолютно сухого вещества. Определение родовой принадлежности микробиоценоза ферментируемой массы и конечного продукта подтвердило, что температурный режим проведения процесса обеспечивал уничтожение санитарно-показательных микроорганизмов, изначально присутствующих в исходной смеси (*E. coli*, *Citrobacter*, *Proteus*), и начиная с пастеризационного периода способствовал активному развитию непатогенных и неболезнетворных бактерий рода *Bacillus* (*B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* и *B. altitudinis*). Микробиологическая оценка полученного продукта ферментации позволяет рекомендовать его к использованию в качестве экологически безопасного органического удобрения.

Ключевые слова: микроорганизмы, мезофилы, термофилы, навоз, коэффициент минерализации, ускоренная ферментация

Для цитирования: Фомичева Н.В., Рабинович Г.Ю., Прутенская Е.А., Смирнова Ю.Д. Микробиологическая оценка процесса ускоренной твердофазной ферментации органического сырья. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 2. С. 236–243. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-236-243>

Microbiologic assessment of accelerated solid-state fermentation of agricultural organic wastes

Natalia V. Fomicheva*, Galina Yu. Rabinovich*,
Ekaterina A. Prutenskaya**, Yulia D. Smirnova*

*FRC V.V. Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, Russian Federation

**Tver State Technical University, Tver, Russian Federation

Abstract: Livestock and poultry wastes, when effectively managed, become feedstock for organic fertiliser production. Researchers from the All-Russian Research Institute of Reclaimed Lands, the branch of Federal Research Center “V.V. Dokuchaev Soil Science Institute”, proposed an accelerated regimen of cattle manure solid-phase fermentation with peat: 48 h at 37 °C, then 48 h at 60 °C and 24 h at 37 °C, terminating with nat-

ural cooling of the fermented mass. A distinctive feature of the proposed accelerated fermentation is maintenance of set-point temperatures. The aim of the work is to perform a microbiological evaluation of the process of accelerated solid-phase fermentation. An experiment was carried out in a 1.75 dm³ laboratory fermenter. During the fermentation, we studied the number of microorganisms, which use organic and mineral nitrogen forms, using the limiting dilution method, as well as the species membership by mass spectrometry. The experimental findings showed that the temperature regime of the main fermentation steps yielded the maximum number of mesophilic and thermophilic nitrogen-transforming microorganisms. Their active growth caused the intensive transformation of the fermented mixture, as evidenced by mesophilic and thermophilic mineralisation coefficients. At the end of the process, the linear mineralisation coefficients were used to assess the completion of the fermentation product transformation and stabilisation. The fermentation product comprised a high number of nitrogen-transforming microorganisms (on average, 3.5±0.3108 COE/g on a dry weight basis). The determination of the microbiota species membership in the fermented mass and the final product confirmed that the process temperature regime ensured the elimination of the sanitary-indicator microorganisms present in the original mixture (*E. coli*, *Citrobacter*, *Proteus*). In addition, during pasteurisation, this regime led to the active development of non-pathogenic *Bacillus* bacteria (*B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* and *B. altitudinis*). The fermentation product is recommended for use as an environmentally safe organic fertiliser based on the microbiological evaluation.

Keywords: microorganisms, mesophiles, thermophiles, manure, mineralisation coefficient, accelerated fermentation

For citation: Fomicheva NV, Rabinovich GYu, Prutenskaya EA, Smirnova YuD. Microbiologic assessment of accelerated solid-state fermentation of agricultural organic wastes. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):236–243. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-236-243>

ВВЕДЕНИЕ

Скопление помета и навоза оказывает негативное влияние на экологическое благополучие прилегающих территорий птицеводческих и животноводческих комплексов или хозяйств. В то же время указанные отходы имеют высокий уровень биогенности, в их составе содержится большое количество макро- и микроэлементов, физиологически активных веществ. Это позволяет рассматривать отходы птицеводства и животноводства в качестве основного ресурса при производстве органических удобрений.

Перспективным способом переработки отходов животноводства и птицеводства в органические удобрения является ускоренная ферментация органического сырья в реакторах или ферментерах различного конструктивного исполнения [1, 2]. Разработанные технологические параметры проведения ферментации направлены на обеспечение эффективной трансформации исходной смеси, минимизацию потерь элементов питания и существенное сокращение сроков получения органического удобрения¹ [3]. Например, в закрытом реакторе объемом 32 л в адиабатических условиях компостирование птичьего помета длится 14 дней [4], а в ферментерах камерного типа, представляющих собой отдельные сооружения, спустя 7–10 суток аэробной ферментации из отходов животноводства формируется качественное органическое удобрение [5]. Известны также технологии ускоренного непрерывного производства органического удобрения

в реакторах барабанного типа, где время переработки твердого навоза составляет 7 дней [6] или даже 3–4 суток [7, 8].

Во Всероссийском научно-исследовательском институте мелиорированных земель (ВНИИМЗ) – ныне филиале ФИЦ «Почвенный институт им. В.В. Докучаева» разработан способ ускоренной твердофазной ферментации навоза крупного рогатого скота (КРС), включающий все основные этапы классического компостирования: разогрев исходной смеси; далее сохранение высокой температуры, в результате чего уничтожается патогенная микрофлора; затем постепенное охлаждение ферментируемой массы и стабилизация готового продукта. Отличительной чертой ускоренной ферментации является искусственное поддержание заданной температуры ферментируемой смеси, что позволяет независимо от времени года гарантированно получать качественное, экологически безопасное органическое удобрение.

Цель работы – провести микробиологическую оценку процесса ускоренной твердофазной ферментации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперимент проводили в лабораторных условиях. Исходным сырьем являлся свежий навоз КРС и переходный торф, используемый в качестве влагопоглощающего и углеродсодержащего компонента. Ингредиенты объединяли и

¹Кутровский В.Н., Сидоренко О.Д. Биоконверсия отходов агропромышленного комплекса: учеб. пособие. М.: Инфра-М, 2018.160 с.

тщательно перемешивали. Готовая исходная смесь имела следующие характеристики: влажность – 68%; pH_{KCl} – $7,63 \pm 0,03$; С – $41,5 \pm 1,3\%$; $N_{общ}$ – $1,56 \pm 0,07\%$.

Ускоренную твердофазную ферментацию проводили в лабораторном ферментере, корпус которого выполнен из нержавеющей стали, имеет форму цилиндра с плоским дном и крышкой. Для обеспечения аэрации ферментируемой смеси внутри корпуса располагается перфорированная барботажная трубка, которая посредством бокового штуцера соединена с компрессором. Полезный объем ферментера – $1,75 \text{ дм}^3$. Исходную смесь загружали внутрь ферментера, закрывали крышкой, затем его устанавливали в термостат для поддержания заданной температуры. Процесс ускоренной твердофазной ферментации осуществляли по следующей схеме: 48 ч при 37°C , затем 48 ч при 60°C , далее 24 ч при 37°C , после чего процесс заканчивался естественным остыванием ферментируемой массы до температуры окружающей среды.

Переработку отходов животноводства ускоренной твердофазной ферментацией проводили дважды. Из исходной смеси и далее из ферментируемой массы один раз в сутки отбирали образцы, в которых методом предельных разведений на твердых питательных средах в трехкратной аналитической повторности определяли численность мезофильных (инкубация при 28°C) и термофильных (инкубация при 55°C) микроорганизмов, доминирующих в подобных процессах ферментации [9, 10]: использующих минеральные формы азота – на крахмало-аммиачном агаре (КАА), использующих органические формы азота – на мясопептонном агаре (МПА). Соотношение численности указанных микроорганизмов (КАА/МПА) представляет собой значение условного коэффициента минерализации по азоту, по величине которого оценивали интенсивность минерализационных процессов, происходящих в ферментируемой массе [10].

Кроме этого в отобранных образцах осуществляли идентификацию видовой принадлежности микроорганизмов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе MicroFlex (Bruker, Германия).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel и STATGRAPHICS Centurion XVI.II. При обработке полученных данных использовали элементы вариационной статистики: среднеарифметические значения и доверительный интервал конкретного значения (объем выборки $n = 6$). Статистическую значи-

мость отличий анализировали с использованием t -критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку ферментация происходит под влиянием микроорганизмов, то создание благоприятных условий для их жизнедеятельности способствует более качественному преобразованию исходного сырья. Известно, что в процессе ферментации органической смеси участвуют представители различных таксономических групп микроорганизмов, которые способны приспосабливаться к изменениям внешней среды (влажности, температуры, pH и др.) и выполнять свою роль¹ [3]. Выбор температурных условий и сроков проведения процесса ускоренной ферментации, использованных в данной работе, основывался на представлении о классическом компостировании и результатах предыдущих исследований [11] и был направлен на эффективное использование потенциала микрофлоры исходного сырья.

В первые сутки выдерживания ферментируемой смеси при температуре 37°C наблюдался максимальный рост численности исследуемых групп микроорганизмов – их количество увеличилось более чем в три раза по сравнению с исходной смесью (таблица). Известно, что микроорганизмы, потребляя питательные компоненты ферментируемой массы, активно развиваются, процессы их жизнедеятельности приводят к образованию легкоусвояемых соединений, биологически активных веществ, участвующих в дальнейших процессах трансформации ферментируемой смеси².

Дальнейшее поддержание указанной температуры приводило к некоторому уменьшению численности мезофильных микроорганизмов, а после 24 ч при 60°C наблюдалось резкое снижение их количества – в 5,2 и 3,8 раза для микроорганизмов, использующих органические и минеральные формы соответственно (см. таблицу). Тем не менее установление пастеризационного периода направлено на обеззараживание получаемого продукта, включающее гибель термочувствительных патогенных микроорганизмов и ликвидацию всхожести семян сорных растений [12]. Известны исследования по компостированию навоза КРС, в которых *Escherichia coli* O157:H7 не была обнаружена после 72 ч при 45°C , а *Salmonella enteritidis* – через 48 ч при той же температуре [13]. Считается, что температура смеси $55\text{--}60^\circ\text{C}$, действующая от нескольких минут до нескольких дней, наиболее эффективна¹ [3]. Соответственно, в нашем эксперименте проведение пастеризационного периода в течение 48 ч хотя и приводило

²Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология: учебник для академического бакалавриата; 8-е изд., испр. и доп. М.: Юрайт, 2018. 445 с.

Количество мезофильных микроорганизмов в процессе ускоренной ферментации

Number of mesophilic microorganisms in the process of accelerated fermentation

| Температурный режим ускоренной ферментации | Микроорганизмы, использующие органические формы азота, $n \cdot 10^8$ КОЕ/г АСВ | Микроорганизмы, использующие минеральные формы азота, $n \cdot 10^8$ КОЕ/г АСВ |
|---|---|--|
| Исходная смесь | $8,6 \pm 0,7^d$ | $4,7 \pm 0,3^c$ |
| Смесь спустя 24 ч при 37 °С | $27,9 \pm 1,5^f$ | $17,6 \pm 0,9^e$ |
| Смесь спустя 48 ч при 37 °С | $15,7 \pm 1,1^e$ | $13,3 \pm 0,9^d$ |
| Смесь спустя 24 ч при 60 °С | $3,0 \pm 0,3^b$ | $3,5 \pm 0,3^b$ |
| Смесь спустя 48 ч при 60 °С | $1,9 \pm 0,2^a$ | $2,1 \pm 0,2^a$ |
| Смесь спустя 24 ч при 37 °С | $3,9 \pm 0,2^c$ | $2,8 \pm 0,2^b$ |
| Смесь спустя 24 ч естественного остывания (продукт ферментации) | $4,1 \pm 0,3^c$ | $3,0 \pm 0,3^b$ |

Примечание. Представлены среднеарифметические значения численности микроорганизмов с доверительным интервалом ($n = 6$); в каждом столбце разными буквами обозначены статистически значимые различия ($p < 0.05$); АСВ – абсолютно сухое вещество.

к существенному снижению мезофильной азот-трансформирующей микрофлоры, но при этом создавало гарантированные условия для обеспечения санитарно-микробиологической безопасности конечного продукта и способствовало развитию термофильных микроорганизмов.

В пастеризационный период за счет жизнедеятельности термофильной микрофлоры в процессы трансформации вовлекаются более устойчивые соединения, происходит деградация биополимеров, способствующая формированию более качественного продукта¹ [4]. Если в начале процесса ферментации численность термофильных микроорганизмов, использующих органический и минеральный азот, составляла $11,3 \pm 1,1 \cdot 10^6$ КОЕ/г АСВ и $3,4 \pm 0,5 \cdot 10^6$ КОЕ/г АСВ соответственно, то спустя 48 ч при температуре 60 °С их количество достигало максимума – $5,6 \pm 0,7 \cdot 10^8$ КОЕ/г АСВ и $8,1 \pm 0,9 \cdot 10^8$ КОЕ/г АСВ соответственно, что свидетельствовало об активном разложении сложных органических соединений в этот период [14]. Максимумы численности термофилов, потребляющих органические и минеральные формы азота, при 60 °С отмечены и в другом лабораторном эксперименте по компостированию навоза КРС [9].

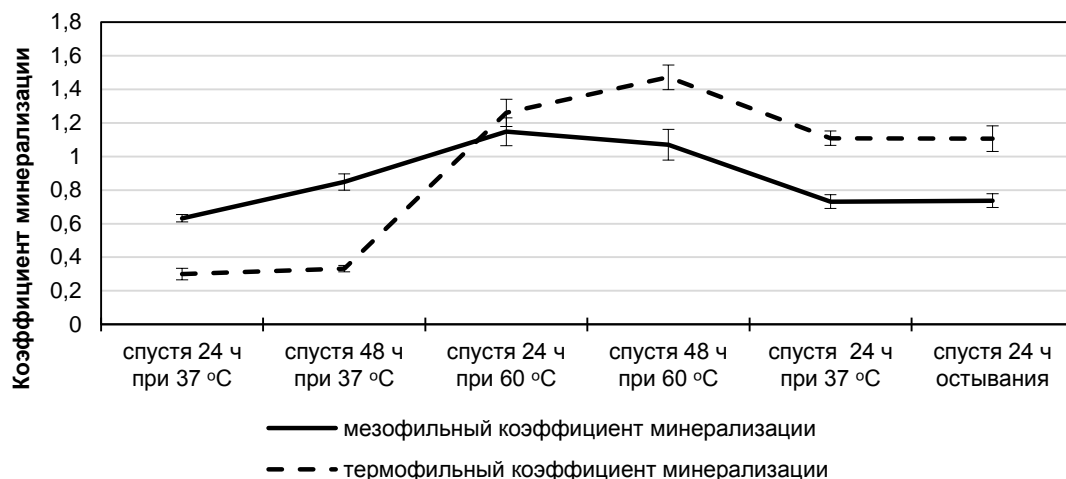
Дальнейший температурный режим – 37 °С, сохранявшийся в течение 24 ч, и последующее естественное остывание ферментируемой массы способствовали плавному завершению процессов трансформации и стабилизации продукта. В этот период количество термофилов постепенно уменьшалось, возобновлялся рост численности исследуемых мезофилов (см. таблицу). Статистическая обработка экспериментальных данных позволила выявить тесную обратную корреляционную зависимость между количеством мезофильных и термофильных азот-трансформирующих микроорганизмов в процессе ферментации: для использующих органический азот коэффициент корреляции (r) составил -0,88, для потребляющих минеральные формы азота – -0,86.

Более подробно об уровне трансформации ферментируемой смеси, осуществляемой, в том числе, исследуемыми микроорганизмами, можно судить по мезофильным и термофильным коэффициентам минерализации, которые представлены на рисунке в виде среднеарифметических значений со стандартным отклонением (объем выборки $n = 6$).

На графиках отчетливо видно, что в начале ферментации в преобразовании ферментируемой массы доминируют мезофильные микроорганизмы, а начиная с пастеризационного периода – термофильная микрофлора. Важно отметить, что линейные мезофильный и термофильный коэффициенты минерализации в конце процесса позволяют судить о завершении процессов трансформации и стабилизации продукта ферментации.

В полученном продукте ферментации отмечена достаточно высокая численность азот-трансформирующих микроорганизмов – в среднем $3,5 \pm 0,3 \cdot 10^8$ КОЕ/г АСВ. Однако это значение может варьировать в зависимости от партии навоза КРС, на состав которого, как известно, определяющее влияние оказывает возраст, условия содержания и кормления животных [15]. Тем не менее выявленные закономерности будут сохраняться.

По численности азот-трансформирующей микрофлоры продукт ферментации можно сравнить с известными аналогами. Так, в биоудобрении Полифункур, полученном сотрудниками Института микробиологии НАН Беларуси и Института природопользования НАН Беларуси в лабораторном биореакторе путем переработки куриного помета, численность микроорганизмов, использующих органический азот, достигала $1,1 \pm 0,04 \cdot 10^7$ КОЕ/г АСВ, а усваивающих минеральные формы азота – $0,6 \pm 0,05 \cdot 10^7$ КОЕ/г АСВ. [3]. В биоудобрении Омуг, разработанном сотрудниками ВНИИСХМ и ИАЭП на основе аэробной ферментации помета, численность аммонификаторов составляет $9 \cdot 10^7$ КОЕ/г АСВ. [16].



Коэффициенты минерализации в процессе ускоренной ферментации

Mineralization coefficients in the process of accelerated fermentation

Продукт, полученный ускоренной ферментацией, рекомендуется использовать в качестве органического удобрения, поэтому он должен соответствовать требованиям ГОСТ Р 53117-2008. Удобрения органические на основе отходов животноводства. Технические условия. В частности, в органическом удобрении должны отсутствовать патогенные и болезнетворные микроорганизмы, а индекс санитарно-показательных микроорганизмов не должен превышать 9 клеток/г. В связи с этим на всех основных этапах получения продукта ферментации была установлена родовая принадлежность микроорганизмов.

Использование различных температурных режимов проведения твердофазной ферментации отразилось на сукцессии микроорганизмов. Вследствие того что в процессе ферментации использовался свежий навоз КРС, в исходной смеси преобладали обитатели кишечника коровы – бактерии семейства *Enterobacteriaceae*: представители родов *Escherichia*, в частности, *E. coli*, *Citrobacter* и *Proteus*. Поскольку температура 37 °С является оптимальной для их развития, то указанные микроорганизмы были выявлены и после первых двух суток ферментации. Последующий пастеризационный период (48 ч при 60 °С) обеспечил уничтожение вышеперечисленных санитарно-показательных микроорганизмов и в ферментируемой смеси стали преобладать бактерии рода *Bacillus*: *B. megaterium* и *B. subtilis*. Способность к синтезу внеклеточных гидролитических ферментов, к расщеплению сложных природных полимеров позволяет становиться этим микроорганизмам доминирующими в процессе компостирования. Бактерии рода *Bacillus* способны образовывать эндоспores, что позволяет им осуществлять колонизацию компоста в термофильной фазе [17].

В готовом продукте ферментации были обнаружены и другие виды бактерий рода *Bacillus* –

B. licheniformis, *B. pumilus* и *B. altitudinis*. Подобные результаты (доминирование бактерий *Bacillus* spp. в термофильной фазе компостирования навоза КРС и после нее получены и в других исследованиях [18, 19].

Поскольку бактерии рода *Bacillus* характеризуются полиферментативными свойствами [20, 21], то их жизнедеятельность способствовала более эффективному преобразованию ферментируемой массы, что в свою очередь отразилось на формировании качественного продукта ферментации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный способ ускоренной твердофазной ферментации отходов животноводства представляет собой модель классического компостирования. Существенное сокращение сроков переработки навоза КРС обеспечивали технические и технологические параметры процесса. Искусственное поддержание заданной температуры способствовало быстрому выходу процесса на рабочий режим и активной трансформации ферментируемой массы за счет жизнедеятельности мезофильных и термофильных микроорганизмов. Коэффициенты минерализации свидетельствовали о стабилизации конечного продукта. Продукт ферментации характеризовался высокой численностью азоттрансформирующих микроорганизмов (в среднем $3,5 \pm 0,3 \cdot 10^8$ КОЕ/г АСВ) и экологической безопасностью. Определение видовой принадлежности микрофлоры ферментируемой массы подтвердило, что предложенный температурный режим проведения ускоренной ферментации обеспечивает уничтожение санитарно-показательных микроорганизмов и способствует активному развитию бактерий рода *Bacillus*: *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* и *B. altitudinis*, которые не являются патогенными и болезнетворными микроорганизмами и безопасны для человека.

Микробиологическая оценка полученного

продукта ферментации позволяет рекомендовать его к использованию в качестве органического удобрения. При изготовлении соответствующей конструкции ферментера и строгом

соблюдении технологических параметров проведения процесса можно обеспечить производство органического удобрения на основе отходов животноводства в промышленном масштабе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shuhang W.U., Zhenfang J., Qingying Y.U. Progress in technologies of the composting animal manure // *Acta Agriculturae Shanghai*. 2003. Vol. 19. Issue 1. P. 50–52.
2. Фомичева Н.В., Рабинович Г.Ю., Молчанов В.П., Сульман Э.М. Современные технологии биопереработки возобновляемых сырьевых ресурсов // *Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология*. 2018. N 2. С. 263–273.
3. Иванов А.И., Лапа В.В., Ковалев Н.Г., Иванов И.А., Рабинович Г.Ю., Иванов Д.А. [и др.]. Производство, изучение и применение удобрений на основе птичьего помета / под общ. ред. А.И. Иванова. СПб.: ФГБНУ АФИ, 2018. 317 с.
4. Petric I., Selimbasic V. Composting of poultry manure and wheat straw in a closed reactor: optimum mixture ratio and evolution of parameters // *Biodegradation*. 2008. Vol. 19. Issue 1. P. 53–63. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9114-x>
5. Пат. № 2112764, Российская Федерация. Способ приготовления компоста многоцелевого назначения / Н.Г. Ковалев, Б.М. Малинин, И.П. Туманов; патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственного использования мелиорированных земель; заявл. 22.01.1997; опублик. 10.06.1998.
6. Vuorinen A.H., Saharinen M.H. Effects of process conditions on composting efficiency and nitrogen immobilization during composting of manure in a drum composting system // *Acta Horticulturae*. 1998. Vol. 469. P. 89–96. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.469.8>
7. Uvarov R., Briukhanov A., Shalavina E. Study results of mass and nutrient loss in technologies of different composting rate: case of bedding poultry manure. In: *Engineering for Rural Development: 15th international scientific conference*. 25–27 Maj 2016, Jelgava. Jelgava, Latvia University of Agriculture. P. 851–857.
8. Шалавина Е.В., Брюханов А.Ю., Васильев Э.В., Уваров Р.А., Валге А.М. Биоферментация органических отходов свиноводческого комплекса в установке барабанного типа // *Аграрная наука*. 2020. N 6. С. 51–56. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-339-6-51-56>
9. Лопес де Гереню В.О., Курганова И.Н. Физико-химические и микробиологические аспекты процесса аэробного компостирования // *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. 1995. N 4. С. 51–54.
10. Ковалев Н.Г., Рабинович Г.Ю. Микробиологические особенности аэробной ферментации // *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. 1999. N 3. С. 23–25.
11. Рабинович Г.Ю., Ковалев Н.Г., Фомичева Н.В. Новый вид биологически активных средств: получение, состав, перспективы использования // *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2007. N 3. С. 71–73.
12. Sasáková N., Venglovský J., Papajová I., Juriš P., Ondrašovičová O., Ondrašovič M., et al. Vplyv teploty na prežívanie vybraných skupín mikroorganizmov počas kompostovania hydinového trusu // *Slovenský Veterinársky Časopis*. 2010. Vol. 35. Issue 1. P. 43–47.
13. Lung A.J., Lin C.M., Kim J.M., Marshall M.R., Nordstedt R., Thompson N.P., et al. Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Enteritidis* in cow manurecomposting // *Journal of Food Protection*. 2001. Vol. 64. Issue 9. P. 1309–1314. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.9.1309>
14. Saludes R.B., Iwabuchi K., Kayanuma A., Shiga T. Composting of dairy cattle manure using a thermophilic-mesophilic sequence // *Biosystems Engineering*. 2007. Vol. 98. Issue 2. P. 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2007.07.003>
15. Van Vliet P.C.J., Reijs J.W., Bloem J., Dijkstra J., de Goede R.G.M., Effects of cow diet on the microbial community and organic matter and nitrogen content of feces // *Journal of Dairy Science*. 2007. Vol. 90. Issue 11. P. 5146–5158. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0065>
16. Архипченко И.А., Бакина Л.Г., Брюханов А.Ю., Орлова О.В., Тарасов С.И. Трансформации микробного сообщества и органического субстрата при аэробной ферментации помета // *Экология и промышленность России*. 2020. Т. 24. N 8. С. 22–27. <https://doi.org/10.18412/1816-0395-2020-8-22-27>
17. Varma V.S., Das S., Sastri C.V., Kalamdh A.S. Microbial degradation of lignocellulosic fractions during drum composting of mixed organic waste // *Sustainable Environment Research*. 2017. Vol. 27. Issue 6. P. 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2017.05.004>
18. Sasaki H., Nonaka J., Otawa K., Kitazume O., Asano R., Sasaki T., et al. Analysis of the structure of the bacterial community in the livestock manure-based composting process // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2009. Vol. 22. Issue 1. P. 113–118. <https://doi.org/10.5713/ajas.2009.70658>
19. Tang J.-C., Kanamori T., Inoue Y., Yasuta T., Yoshida S., Katayama A. Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method // *Process Biochemistry*. 2004. Vol. 39. Issue 12. P. 1999–2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.029>

20. Gutierrez-Manero F.J., Ramos-Solano B., Probanza A., Mehrouachi J., Tadeo F.R., Talon M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high mounts of physiologically active gibberellins // *Physiologia Plantarum*. 2001. Vol. 111. Issue 2. P. 206–211. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.20>

01.1110211.x

21. Михайлова Н.А., Гринько О.М. Бактерии рода *Bacillus* – продуценты биологически активных веществ антимикробного действия // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2010. N 3. С. 85–89.

REFERENCES

1. Shuhang WU, Zhenfang J, Qingying YU. Progress in technologies of the composting animal manure. *Acta Agriculturae Shanghai*. 2003;19(1):50–52.

2. Fomicheva NV, Rabinovich GYu, Molchanov VP, Sulman EM. Modern technologies of bioprocessing of renewable raw material resources. *Vestnik Tverskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya i ekologiya = Bulletin of Tver State University. Series: Biology and Ecology*. 2018;2: 263–273. (In Russian)

3. Ivanov AI, Lapa VV, Kovalev NG, Ivanov IA, Rabinovich GYu, Ivanov DA, et al. *Manufacturing, investigation and application of fertilizers based on the chicken manure*. St. Petersburg: Izdatel'stvo Agrofizicheskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta; 2018. 317 p. (In Russian)

4. Petric I, Selimbasic V. Composting of poultry manure and wheat straw in a closed reactor: optimum mixture ratio and evolution of parameters. *Bio-degradation*. 2008;19(1):53–63. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9114-x>

5. Kovalev NG, Malinin BM, Tumanov IP. *Method of producing multitarget composts*. Patent RF, no. 2112764; 1997. (In Russian)

6. Vuorinen AH, Saharinen MH. Effects of process conditions on composting efficiency and nitrogen immobilization during composting of manure in a drum composting system. *Acta Horticulturae*. 1998;469:89–96. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.469.8>

7. Uvarov R, Briukhanov A, Shalavina E. Study results of mass and nutrient loss in technologies of different composting rate: case of bedding poultry manure. In: *Engineering for Rural Development: Proceedings of 15th International Scientific Conference*. 25–27 Maj 2016, Jelgava. Jelgava, Latvia University of Agriculture, p. 851–857.

8. Shalavina EV, Briukhanov AYU, Vasilev EV, Uvarov RA, Valge AM. Biofermentation of organic waste from a pig-breeding complex in a drum-type installation. *Agrarnaya nauka = Agrarian science*. 2020;6:51–56. (In Russian) <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-339-6-51-56>

9. Lopes de Gerenyu VO, Kurganova IN. Physicochemical and microbiological aspects of the aerobic composting process. *Vestnik Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk*. 1995;4:51–54. (In Russian)

10. Kovalev NG, Rabinovich GVu. Microbiological features of aerobic fermentation. *Doklady Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk*. 1999;3:23–25. (In Russian)

11. Rabinovich GVu, Kovalev NG, Fomicheva NV. A new kind of biologically active means: production, composition, prospects of application. *Vestnik Rossiiskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk*. 2007;3:71–73. (In Russian)

12. Sasáková N, Venglovský J, Papajová I, Juriš P, Ondrašovičová O, Ondrašovič M, Lactičová K, Gregová G. The effect of temperature on microorganism surviving during composting of poultry manure. *Slovenský Veterinársky Časopis*. 2010;35(1): 43–47. (In Slovenian)

13. Lung AJ, Lin CM, Kim JM, Marshall MR, Nordstedt R, Thompson NP, et al. Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Enteritidis* in cow manurecomposting. *Journal of Food Protection*. 2001;64(9):1309–1314. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.9.1309>

14. Saludes RB, Iwabuchi K, Kayanuma A, Shiga T. Composting of dairy cattle manure using a thermophilic-mesophilic sequence. *Biosystems Engineering*. 2007;98(2):198–205. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2007.07.003>

15. Van Vliet PCJ, Reijs JW, Bloem J, Dijkstra J, de Goede RGM. Effects of cow diet on the microbial community and organic matter and nitrogen content of feces. *Journal of Dairy Science*. 2007;90(11): 5146–5158. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0065>

16. Arkhipchenko IA, Bakina LG, Bruhanov AYU, Orlova OV, Tarasov SI. Transformation in the microbial community and of organic substrate during aerobic fermentation of manure. *Ekologia i promyshlennost Rossii = Ecology and Industry of Russia*. 2020;24(8):22–27. (In Russian) <https://doi.org/10.18412/1816-0395-2020-8-22-27>

17. Varma VS, Das S, Sastri CV, Kalamdhd AS. Microbial degradation of lignocellulosic fractions during drum composting of mixed organic waste. *Sustainable Environment Research*. 2017;27(6):265–272. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2017.05.004>

18. Sasaki H, Nonaka J, Otawa K, Kitazume O, Asano R, Sasaki T, et al. Analysis of the structure of the bacterial community in the livestock manure-based composting process. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2009;22(1):113–118. <https://doi.org/10.5713/ajas.2009.70658>

19. Tang J-C, Kanamori T, Inoue Y, Yasuta T, Yoshida S, Katayama A. Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method. *Process Biochemistry*. 2004;39(12):1999–2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.029>

20. Gutierrez-Manero FJ, Ramos-Solano B,

Probanza A, Mehouchi J, Tadeo FR, Talon M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high mounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*. 2001;111(2):206–211. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Фомичева Наталья Викторовна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
ВНИИМЗ – филиал ФИЦ «Почвенный институт
им. В.В. Докучаева»,
170530, Тверская обл., Калининский р-н,
п. Эммаус, 27,
Российская Федерация,
✉ e-mail: nvfomi@mail.ru

Рабинович Галина Юрьевна,
д.б.н., профессор, директор
ВНИИМЗ – филиал ФИЦ «Почвенный институт
им. В.В. Докучаева»,
170530, Тверская обл., Калининский р-н,
п. Эммаус, 27,
Российская Федерация,
e-mail: 2016vniimz-noo@list.ru

Прутенская Екатерина Анатольевна,
к.б.н., доцент кафедры биотехнологии,
химии и стандартизации,
Тверской государственный технический
университет,
170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22,
Российская Федерация,
e-mail: prutenskaya@mail.ru

Смирнова Юлия Дмитриевна,
к.б.н., заместитель директора по науке,
ВНИИМЗ – филиал ФИЦ «Почвенный институт
им. В.В. Докучаева»,
170530, Тверская обл., Калининский р-н,
п. Эммаус, 27,
Российская Федерация,
e-mail: ulayad@yandex.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 29.01.2021.
Одобрена после рецензирования 22.03.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.*

21. Mikhaylova NA, Grinko OM. Bacillus genus bacteria are producers of biologically active compounds with antimicrobial effect. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2010;3;85–89. (In Russian)

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalia V. Fomicheva
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
VNIIMZ – branch of FRC V.V. Dokuchaev
Soil Science Institute
27, Emmauss Village, Kalininsky District,
170530, Tver Region,
Russian Federation,
✉ e-mail: nvfomi@mail.ru

Galina Yu. Rabinovich,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Director of VNIIMZ – branch of FRC
V.V. Dokuchaev Soil Science Institute,
27, Emmauss Village, Kalininsky District,
170530, Tver Region,
Russian Federation,
e-mail: 2016vniimz-noo@list.ru

Ekaterina A. Prutenskaya,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Department of Biotechnology, Chemistry
and Standartization,
Tver State Technical University,
22, A. Nikitin St., Tver, 170026,
Russian Federation,
e-mail: prutenskaya@mail.ru

Yulia D. Smirnova,
Ph.D. (Biology), Deputy Director for Science,
VNIIMZ – branch of FRC V.V. Dokuchaev
Soil Science Institute,
27, Emmauss Village, Kalininsky District,
170530, Tver Region,
Russian Federation,
e-mail: ulayad@yandex.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

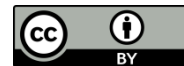
*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 29.01.2021.
Approved after reviewing 22.03.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 544.777

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-244-250>



Анализ степени ветвления амилопектина и содержания амилозы в картофельных крахмалах по данным микрокалориметрии

© Ю.И. Матвеев*, Е.В. Аверьянова**

* Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН,
г. Москва, Российская Федерация

** Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО
«Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова»,
г. Бийск, Российская Федерация

Резюме: Гидроксиэтилированные крахмалы представляют определенный интерес для использования в инфузионной терапии благодаря высокому волемическому эффекту, продолжительность которого зависит от времени циркуляции препарата в крови: чем выше концентрация, молекулярный вес и степень замещения полимера, тем больше и продолжительней увеличивается объем циркулирующей крови. При этом известно, что гидроксиэтилированные крахмалы отличаются большим диапазоном молекулярного веса и степени замещения, что позволяет их растворам длительное время (до 10 ч) циркулировать в кровяном русле без утечки активного вещества в интерстиции жизненно важных органов. Показано, что зависимость температуры плавления кристаллической ламели крахмала от числа глюкозных остатков можно описать с помощью модифицированного соотношения Фокса – Лошаека, которое учитывает степень разветвления молекул амилопектина и содержание амилозы в крахмале. Предложено аналитическое выражение для оценки степени ветвления амилопектина картофельных крахмалов по данным микрокалориметрии. Полученные выражения позволяют отобрать те генотипы картофеля, у которых амилопектин имеет наиболее высокую степень ветвления, а крахмал содержит минимальное количество амилозы. Крахмалы таких сортов картофеля могут быть использованы при изготовлении заменителей плазмы крови – гидроксиэтилированных крахмалов, обладающих хорошими фармакодинамическими свойствами. В рамках развиваемого подхода можно определить влияние степени замещения на термодинамические свойства исследуемых крахмалов через изменение температуры плавления ламели T_m и таким образом оценить основные параметры, определяющие фармакодинамику замещенных крахмалов.

Ключевые слова: амилоза, амилопектин, крахмал, генотип картофеля, степень ветвления, термодинамические параметры, микрокалориметрия

Благодарности: Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки РФ (мнемокод 0611-2020-013, номер темы – FZMM-2020-0013, ГЗ № 075-00316-20-01).

Для цитирования: Матвеев Ю.И., Аверьянова Е.В. Анализ степени ветвления амилопектина и содержания амилозы в картофельных крахмалах по данным микрокалориметрии. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 2. С. 244–250. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-244-250>

Microcalorimetric investigation of amylopectin branching and the content of amylose in potato starches

Yuri I. Matveev*, Elena V. Averyanova**

* N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS,
Moscow, Russian Federation

** Biysk Technological Institute (branch) of the Altay State Technical University,
Biysk, Russian Federation

Abstract: Hydroxyethylated starches are of particular interest for applications in infusion therapy because of their high volemic effect. The duration of this effect depends on the circulation time of the drug in the blood, i.e., the volume of circulating blood increases with an increase in the concentration, molecular weight and degree of polymer substitution. It is known that hydroxyethylated starches have a wide range of molecular weight and degree of substitution. This allows their solutions to circulate for a long time (up to 10 hours) in the bloodstream without leakage of the active substance into the interstitium of vital organs. The dependence of the melting point of the crystalline starch lamella on the number of glucose residues can be described using the modified Fox – Loshaek ratio, which takes into account the degree of branching of amylopectin molecules and the content of amylose in starch. We proposed an analytical expression for the evaluation of the degree of branching of amylopectin from potato starch based on microcalorimetric data. The proposed methodology allows the genotypes of potatoes with the highest degree of amylopectin branching and a minimum quantity of amylose in starch to be selected. Starches of such potato varieties can be used in the blood plasma substitutes production - hydroxyethylated starches that have good pharmacodynamic properties. Within the developed approach, it is possible to determine the effect of the degree of substitution on the thermodynamic properties of the studied starches through a change in the melting temperature of the lamella, T_m , hence estimating the main pharmacodynamic parameters of substituted starches.

Keywords: amylose, amylopectin, starch, potato genotype, branching degree, thermodynamic parameters, microcalorimetry

Acknowledgments: This work was supported by the project 075-00316-20-01 (FZMMM-2020-0013, mnemonic code 0611-2020-013) from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

For citation: Matveev Yul, Averyanova EV. Microcalorimetric investigation of amylopectin branching and the content of amylose in potato starches. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):244–250. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-244-250>

ВВЕДЕНИЕ

В клинической практике широко применяются кровезаменители на основе гидроксиэтилированного крахмала (ГЭК) [1–3], получаемого либо из амилопектинового крахмала восковидной кукурузы *Zea mays convar. Ceratina*, либо восковидного картофеля *Solanum ajanhuri*. [4]

Амилопектин – разветвленный полимер крахмала, содержащийся в различных природных источниках, может отличаться степенью разветвления. Степень разветвления (degree of branching, DB) – доля остатков глюкозы при разветвлении к общему числу остатков глюкозы в амилопектине. Другая, не менее важная характеристика ГЭК, – степень замещения (СЗ), которая показывает долю замещенных гидроксиэтильной группой остатков глюкозы к их общему количеству. Тип

замещения определяют по отношению С-2/С-6, которое указывает позицию гидроксиэтильной группы в молекуле глюкозы: чем выше отношение, тем медленнее распад ГЭК. Молярное замещение, молекулярная масса и отношение С-2/С-6 – основные параметры, определяющие фармакодинамику ГЭК [5]. Молекулярная масса ГЭК *in vivo* определяет его коллоидную активность [6]. Таким образом, при выведении новых сортов картофеля для получения ГЭК существенную роль играют значения DB и СЗ.

В работе [7] исследовано влияние генотипа картофеля и условий его роста на термодинамические характеристики крахмала – температуру плавления, T_m , и значение кооперативной единицы плавления, v , кристаллической ламеллы картофельных крахмалов (табл. 1).

Таблица 1. Термодинамические параметры плавления кристаллической ламеллы крахмалов из клубней нетрансформированного (*WT*) и трансгенного (*D12*) растений, культивируемых *in vitro* (I) и *in vivo* (II)

Table 1. Thermodynamic parameters of melting of crystalline lamella of starches from tubers of untransformed (*WT*) and transgenic (*D12*) plants cultivated *in vitro* (I) and *in vivo* (II)

| Генотип картофеля | Условия культивирования | $(T_m)_{exp}$, К | $(T_m)_{cal}$, К | v , отн. ед. | L_{F-L} |
|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|----------------|-----------|
| <i>WT</i> | I | 338,9±0,2 | 338,8 | 14,5±0,3 | -4,4 |
| | II | 342,8±0,0 | 342,7 | 10,9±2,1 | |
| <i>D12</i> | I | 341,4±0,1 | 335,5 | 7,0±0,1 | -8,4 |
| | II | 344,5±0,3 | 340,3 | 13,5±0,4 | |

Полученная зависимость T_m от v может быть описана аналитически. Однако соотношение Фокса – Флори

$$T_g = T_{g(\infty)} - k/M, \quad (1)$$

которое широко используется для описания зависимости температуры стеклования полимера T_g от молекулярного веса макромолекулы M (степени полимеризации) [8], не всегда правильно описывает экспериментальные данные при малых молекулярных весах. В случае олигомеров, когда степень полимеризации приближается к 10, наблюдаются отклонения от зависимости (1). На это явление обратили внимание еще Фокс и Лошаек в работе [9], где они вместо выражения (1) предложили следующую зависимость:

$$T_g = T_{g(\infty)} - K^*/(M+M^*). \quad (2)$$

Соотношение (2) хорошо описывает температуру стеклования T_g олигомеров или структур, возникающих при синтезе макромолекул, например, ламелей, образующихся при синтезе амилопектина. Однако соотношение в той форме, как оно представлено, требует знания величин K^* и M^* , которые для олигомеров различного класса будут отличаться друг от друга. Последнее связано с тем, что на температуру стеклования (плавления) полимера существенное влияние начинают оказывать химическое строение концевых групп цепи [10] и ряд других факторов, в частности, разветвления полимерных цепей, содержание амилозы и др.

В настоящей работе показано, что зависимость температуры плавления кристаллической ламели крахмала T_m от числа гликозидных остатков v можно описать с помощью модифицированного соотношения Фокса – Лошаека, которое учитывает DB молекул амилопектина и содержание амилозы. Обычно для этих целей используют несколько методов: высокотемпературная ^1H ЯМР-спектроскопия и высокоэффективная жидкостная хроматография [11], потенциометрическое титрование йодом, на данные которых мы будем ориентироваться в дальнейших оценках. Предложенный подход может быть использован для анализа указанных выше величин по данным микрокалориметрии в процессе генетического эксперимента по модификации картофеля.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В настоящей работе рассмотрены закономерности влияния степени замещения на термодинамические свойства крахмалов, выделенных из полученных ранее в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва, Россия) и описанных в [7], генотипов картофеля

(*Solanum tuberosum* L., сорт Дезире), различающихся соотношением фракций амилозы и амилопектина: *WT* образец нетрансформированного дикого картофеля и его генотипы с экспрессирующими генами *rolB* и *rolC* из *Agrobacterium rhizogenes*; две линии *AtPHYB* растений: Дара5 (*D5*) и Дара12 (*D12*), выращенных на агаризованной среде *in vitro* (I) и в почве *in vivo* (II).

Термодинамические параметры плавления 0,3%-х водных дисперсий крахмалов определены с помощью высокочувствительной дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) на микрокалориметре ДАСМ-4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аналитическое описание зависимости T_m ламелей от числа глюкозных остатков. Воспользуемся соотношением Фокса – Лошаека (2) для описания зависимости T_m генотипов картофеля, приведенных в табл. 1, от числа глюкозных остатков v . Так как между T_g и T_m существует определенное соотношение, которое зависит от степени упаковки полимера [12], то соотношение (2) можно записать следующим образом:

$$T_m = T_{m(\infty)} - L_{F-L}/(v + v^*). \quad (3)$$

Пусть $T_m(v^*)$ и v^* – температура плавления и степень полимеризации ламели, выше которых T_m как функция от v описывается соотношением Флори – Фокса, а значения $T_m(v^*)$ и v^* не зависят от химического строения концевых групп. Тогда зависимость (3) можно записать следующим образом:

$$T_m = T_m(v^*) - L_{F-L} [(v + v^*)^{-1} - (2v^*)^{-1}]. \quad (4)$$

Для определения параметров L_{F-L} и v^* уравнения (4) воспользуемся данными для генотипов картофеля *WT* и *D12* [7] при разных условиях роста:

$$\Delta T_m = (T_m)_{II} - (T_m)_I = L_{F-L} (-1/(v_{II} + v^*) + 1/(v_I + v^*)) - \text{для } WT, \quad (5)$$

$$\Delta T_m = (T_m)_{II} - (T_m)_I = L_{F-L} (-1/(v_{II} + v^*) + 1/(v_I + v^*)) - \text{для } D12. \quad (6)$$

Полагая, что L_{F-L} и v^* одинаковы в уравнениях (5) и (6), найдем $v^* = -9,85$ и $L_{F-L} = -4,4$. В дальнейшем будем считать, что v^* постоянна ($v^* = -10$) для рассматриваемых типов картофельных крахмалов, а соответствующее ей значение $T_m(v^*) = 338$ К. Тогда значения L_{F-L} можно найти из выражений (5) и (6), подставляя найденные экспериментальным путем значения ΔT_m , v_{II} и v_I . В табл. 1 приведены вычисленные таким образом значения L_{F-L} для *WT* и *D12*.

Уравнение Фокса – Лошаека хорошо описывает зависимость T_m от v для генотипов *WT* и

rolB, характер поведения T_m от v у D12, но дает большие погрешности при определении температур плавления других генотипов. Последнее связано с тем, что зависимость T_m от v в области v^* имеет более сложный характер, чем это описывается исходным уравнением (3).

Связь коэффициента L_{F-L} с параметрами генотипа картофеля. В работе [13] показано, что k в уравнении (1) пропорционально критической степени полимеризации N_c , которая в свою очередь пропорциональна кубическому корню из объема повторяющегося звена полимера и $T_{g(\infty)}$ [14]. Полагая, что коэффициент L_{F-L} имеет такую же структуру, только вместо $T_{g(\infty)}$ будет $T_m(v^*)$, значение L_{F-L} будет пропорционально либо $(\Delta V_{eg})^{1/3}$, либо $(\Delta V_{gr})^{1/3}$, где ΔV_{eg} и ΔV_{gr} – ван-дер-ваальсовы объемы концевых групп и гликозидного остатка соответственно.

Пусть у генотипа WT $\Delta V_{eg} = \Delta V_{gr}$. Тогда, зная L_{F-L} для каждого генотипа картофеля, можно вычислить $\Delta V_{eg}/\Delta V_{gr}$. Вычисления показывают, что для некоторых генотипов картофеля, например, rolC, относительные объемы концевых групп имеют бессмысленно большое значение, поэтому в дальнейших оценках будем полагать, что концевые группы у всех генотипов картофеля имеют одинаковый объем, а различие в коэффициентах L_{F-L} определяется числом ответвлений и числом звеньев ламели.

Влияние ветвления амилопектина на коэффициент L_{F-L} . Так как амилопектин относится к классу высоковетвленных полимеров древовидного типа, на его температуру плавления должны влиять число ответвлений и количество звеньев образующих ламели. В зависимости от генотипа фермента, влияющего на ветвление молекулы амилопектина при его синтезе, зависимость температуры стеклования амилопектина от числа звеньев, образующих ламели, будет меняться. В качестве такой зависимости примем выражение из работ [10, 15], в которых рассмотрен разветвленный полиэтилен (ПЭ) с трехфункциональными узлами. Полагая, что в случае амилопектина влияние ветвлений на температуру стеклования/плавления описывается выражением подобного типа, запишем коэффициент Фокса – Лошаака L_{F-L} в виде функции

$$L_{F-L} = L_o \frac{v+a}{v-b} \quad (7)$$

и определим коэффициенты L_o , a и b . Для этого преобразуем выражение (7) к следующему виду:

$$L_{F-L} = L_o \left(1 + \frac{a+b}{v-b} \right). \quad (8)$$

Полагая, как и в работе [15], что $v \gg b$ и пренебрегая членом b/v как величиной более высо-

кого порядка малости, выражение (8) окончательно примет вид

$$L_{F-L} = L_o \left(1 + \frac{A}{v} \right), \quad (9)$$

где $A = a + b$.

Величины L_o и A оценим по значениям L_{F-L} и v для генотипов WT и D12. При этом значения v соответствуют условиям роста II (см. табл. 1). В случае генотипа WT найденные значения будут равны: $L_o = -27,17$ и $A = -9,37$.

В дальнейшем будем считать, что L_o – константа, одинаковая для всех генотипов, а коэффициент A связан со степенью разветвления (DB) амилопектина. Допустим, что эта связь имеет линейный характер, т.е. $A = A_o \cdot DB$. По данным высокотемпературной 1H ЯМР-спектроскопии [11], величина $\langle DB \rangle = 0,05$ мольных долей для картофельных крахмалов. Полагая, что $DB = 0,05$ имеет генотип WT, найдем константу A_o , она будет равна -187.

Из соотношений (4) и (9) для T_m и L_{F-L} можно получить выражение для вычисления DB по данным калориметрии (T_m и v):

$$DB = \frac{v}{187} \left[1 - \frac{T_m - 338}{24.17[(v-10)^{-1} + 0.05]} \right]. \quad (11)$$

В табл. 2 приведены результаты вычислений DB по формуле (11) для различных генотипов картофеля при разных условиях роста. Если в условиях I у генотипов WT, D5 и rolB DB меняется в 1,45 раза, то в случае генотипов D12 и rolC DB меняется в 14,8 раз. Отсюда такое различие в форме и размере клубней, особенно у генотипа rolC [7]. В случае условий роста II (*in vivo*) DB оказывается меньше, чем в случае условий роста I (*in vitro*).

По данным расчетов DB можно определить, какой из генотипов содержит наибольшее количество амилопектина в условиях *in vitro* (I) и *in vivo* (II). Таким генотипом является rolB. Последнее подтверждается данными измерений вязкости для 5%-х водных дисперсий картофельных крахмалов [7]. Вязкость rolB оказалась выше, чем у других генотипов.

Известно, что увеличение содержания амилозы в крахмале приводит к уменьшению DB [16]. Разница между DB *in vitro* и *in vivo* связана с тем, что при способе культивирования *in vivo* образуется больше амилозы, которая понижает значение DB. Зависимость DB от концентрации амилозы C_A можно записать следующим образом:

$$DB = DB_{max}(1 - \xi \cdot C_A). \quad (12)$$

Таблица 2. Зависимость DB и C_A от характеристик крахмала и условий культивирования для различных генотипов картофеля

Table 2. Dependence of DB and C_A on starch characteristics and cultivation conditions for different potato genotypes

| Генотип картофеля | Условия культивирования | $(T_m)_{exp}$, К | v , отн. ед. | $DB \cdot 10^2$ | C_A |
|-------------------|-------------------------|-------------------|----------------|-----------------|-------|
| <i>WT</i> | I | 338,9±0,2 | 14,5±0,3 | 6,68 | 0,06 |
| | II | 342,8±0,0 | 10,9±2,1 | 4,82 | 0,26 |
| <i>D5</i> | I | 340,7±0,0 | 12,5±0,1 | 5,03 | 0,24 |
| | II | 341,4±0,1 | 7,0±0,1 | 5,60 | 0,18 |
| <i>D12</i> | I | 344,5±0,3 | 13,5±0,4 | 1,43 | 0,62 |
| | II | 337,9±0,1 | 13,5±0,3 | 7,31 | 0 |
| <i>rolB</i> | I | 341,7±0,0 | 11,2±1,3 | 4,95 | 0,25 |
| | II | 342,1±0,2 | 17,9±0,2 | 0,38 | 0,73 |

Возьмем в качестве DB_{max} значение $DB = 0,073$ для генотипа *rolB* *in vitro*, а ξ определим из условия, что *in vivo* $C_A = 0,25$ (обычное содержание амилозы в картофельном крахмале [11]). Тогда $\xi = 1,3$. В табл. 2 представлены значения C_A для крахмалов различного типа, вычисленные с помощью выражения (12). Если генотипы *WT* и *rolB* можно отнести к крахмалам обычного типа по содержанию амилозы, то генотип *D12* можно отнести к высокоамилозным (high-amylose) крахмалам, у которых C_A меняется от 0,45 до 0,69.

Обычно в ГЭК восковидного картофеля содержится около 21% амилозы. Соответственно его $DB_{ГЭК} = 0,053$. Так как у восковидной кукурузы DB в 1,32 раза больше, чем у картофеля [12], то ее $DB_{ГЭК} = 0,07$, а концентрация амилозы $C_A = 3\%$ (у восковидной кукурузы C_A обычно меняется от 1,5 до 3,0%¹).

Таким образом, с помощью выражений (11) и (12) по данным калориметрии можно определить степень разветвления и содержание амилозы в нормальных и амилопектиновых картофельных крахмалах, которые широко используются при изготовлении заменителей плазмы крови ГЭК [11].

ВЫВОДЫ

Влияние числа глюкозных остатков ламели на ее температуру плавления для рассмотренных генотипов картофеля может быть хорошо описано с помощью модифицированного соотношения Фокса – Лошаека. На основании полученного выражения (11) по данным калориметрии можно определить степень разветвления амилопектина, а с помощью выражения (12) оценить содержание амилозы в крахмалах картофеля различных генотипов.

Предложенный метод анализа может быть использован для контроля степени разветвления амилопектина выводимых новых генотипов картофеля по данным исследований в условиях *in vitro* и *in vivo*. Уже на стадии *in vitro* исследований можно определить генотипы картофеля, дающие крахмалы амилопектинового (*WT*, *rolB*) или амилозного (*rolC*) типа, а *in vivo* исследования помогут определить типы почв и их подкормки, наиболее благоприятные для выращивания картофеля с требуемой структурой крахмала.

В рамках развиваемого подхода можно определить влияние степени замещения на термодинамические свойства исследуемых крахмалов через изменение температуры плавления ламели T_m и таким образом оценить основные параметры, определяющие фармакодинамику ГЭК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Халикова Е.Ю. Безопасность и эффективность использования препаратов гидроксиэтилкрахмала в программах инфузионной терапии // Трудный пациент. 2012. Т. 10. N 5. С. 22–29.
- Пустовойт В.Л., Доброхотов Д.А., Нестерова Н.В. Гидроксиэтилкрахмал как альтернативный коллоидный кровезаменитель грубодисперсной природы в современной клинической практике // Open Innovation: сб. ст. VIII Междунар. науч.-практ. конф. (Пенза, 23 апреля 2019 г.). Пенза: Наука и Просвещение, 2019. С. 272–276.
- Giordano G., Pugliese F., Bilotta F. Hydroxy ethyl starch and fluid challenge // European Journal of Anaesthesiology. 2020. Vol. 37. Issue 7. P. 611–621. <https://doi.org/10.1097/EJA.0000000000001147>
- Травень В.Ф., Панов А.В., Долотов С.М., Стрельникова Т.А., Суслов В.В., Гладырев В.В. Сравнительный анализ продуктов гидроксиэтилирования картофельного и кукурузного крахмалов методами газожидкостной хроматографии и ЯМР ¹³C спектроскопии // Химия растительного сырья. 2009. Т. 3. С. 57–61
- Сухотин С.К. Возможности плазмозамещающих растворов гидроксиэтилированного

¹Yangcheng Hanyu. Characterization of normal and waxy corn starch for bioethanol production. Graduate Theses and Dissertations. Iowa State University. 12748. 2012. 78 p. <https://doi.org/10.31274/etd-180810-4856>

крахмала (ГЭК) в реаниматологии и хирургии. Рефортан®, Рефортан® плюс, Стабизол® // Дальневосточный медицинский журнал. 2001. N. S4. С. 68–72.

6. Omar M.N., Shouk T.A., Khaleq M.A. Activity of blood coagulation and fibrinolysis during and after hydroxyethyl starch (HES) colloidal volume replacement // *Clinical Biochemistry*. 1999. Vol. 32. Issue 4. P. 269–274. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(99\)00014-4](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(99)00014-4)

7. Вассерман Л.А., Кривандин А.В., Филатова А.Г., Васильев В.Г., Колачевская О.О., Тарасов В.Ф. [и др.]. Структурные и термодинамические характеристики крахмалов картофеля в зависимости от генотипа растений и условий их культивирования // *Химическая физика* 2020. Т. 39. N 6. С. 63–70. <https://doi.org/10.31857/S0207401X2006014X>

8. Fox T.G., Flory P.J. Second-order transition temperatures and related properties of polystyrene. I. Influence of molecular weight // *Journal of Applied Physics*. 1950. Vol. 21. Issue 6. P. 581–591. <https://doi.org/10.1063/1.1699711>

9. Fox T.G., Loshaek S. Influence of molecular weight and degree of crosslinking on the specific volume and glass temperature of polymers // *Journal of Polymer Science*. 1955. Vol. 15. Issue 80. P. 371–390. <https://doi.org/10.1002/pol.1955.120158006>

10. Askadskii A.A. *Computational materials science of polymers*. United Kingdom: Cambridge International Science Publishing, 2003. 696 p.

11. Sommermeyer K., Cech F., Schossow R. Differences in chemical structures between waxy maize- and potato starch-based hydroxyethyl starch volume therapeutics // *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine*. 2007. Vol. 9. Issue 3. P. 127–133. <https://doi.org/10.1111/j.1778-428X.2007.00071.x>

12. Аскадский А.А., Слонимский Г.Л., Матвеев Ю.И., Коршак В.В. Упаковка макромолекул и температура стеклования полимеров / *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. 1976. Т. 18. N 9. С. 2067–2074.

13. Matveev Yu.I., Plashchina I.G. A dynamic model of the effect of methyl resorcinol on the enzymatic activity of lysozyme // *Polymer Science. Series A*. 2011. Vol. 53. Issue 5. P. 390–396. <https://doi.org/10.1134/S0965545X11050063>

14. Матвеев Ю.И., Аскадский А.А. Определение температуры перехода в вязкотекучее состояние полимеров // *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. 1993. Т. 35. N 1. С. 63–67.

15. Askadskii A.A., Kovriga O.V. Effect of branching on the physical characteristics of polymers // *Polymer Science U.S.S.R.* 1991. Vol. 33. Issue 9. P. 1891–1831. [https://doi.org/10.1016/0032-3950\(91\)90019-M](https://doi.org/10.1016/0032-3950(91)90019-M)

16. Папахин А.А. Лукин Н.Д., Ананских В.В., Бородина З.М. О современных направлениях технологии гидролиза крахмала // *Достижения науки и техники АПК*. 2020. Т. 34. N 12. С. 84–89. <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2020-11214>

REFERENCES

1. Khalikova E.Yu. Safety and efficacy of HES in infusion therapy programs. *Trudnyi patsient*. 2012;10(5):22–29. (In Russian)

2. Pustovoit VL, Dobrokhotov DA, Nesterova NV. Hydroxyethyl starch as an alternative colloidal blood substitute of the coarse nature of modern clinical practice. In: *Open Innovation: Trudy VIII Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii = Open Innovation: Proceedings of VIII International Scientific and Practical Conference*. Penza, 23 April 2019. Penza: Nauka i Prosveshchenie, 2019, pp. 272–276. (In Russian)

3. Giordano G, Pugliese F, Bilotta F. Hydroxyethyl starch and fluid challenge. *European Journal of Anaesthesiology*. 2020;37(7):611–621. <https://doi.org/10.1097/EJA.0000000000001147>

4. Traven VF, Panov AV, Dolotov SM, Strelnikova TA, Suslov VV, Gladyshev VV. Comparative analysis of potato and corn starch hydroxyethylation products by gas-liquid chromatography and ¹³C NMR spectroscopy. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*. 2009;3:57–61. (In Russian)

5. Sukhotin SK. Possibilities of plasma-substituting solutions of hydroxyethylated starch (HES) in resuscitation and surgery. Refortan®, Refortan® plus, Stabizol®. *Dal'nevostochnyi meditsinskii zhurnal*. 2001;S4:68–72. (In Russian)

6. Omar MN, Shouk TA, Khaleq MA. Activity of blood coagulation and fibrinolysis during and after hydroxyethyl starch (HES) colloidal volume replacement. *Clinical Biochemistry*. 1999;32(4):269–274. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(99\)00014-4](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(99)00014-4)

7. Wasserman LA, Krivandin AV, Filatova AG, Vasil'ev VG, Kolachevskaya OO, Tarasov VF, et al. Structural and thermodynamic characteristics of potato starches depending on the plant genotype and their cultivation conditions. *Chimicheskaya fizika = Russian Journal of Physical Chemistry B: Focus on Physics*. 2020;39(6):63–70. (In Russian) <https://doi.org/10.31857/S0207401X2006014X>

8. Fox TG, Flory PJ. Second-Order Transition Temperatures and Related Properties of Polystyrene. I. Influence of Molecular Weight. *Journal of Applied Physics*. 1950;21(6):581–591. <https://doi.org/10.1063/1.1699711>

9. Fox TG, Loshaek S. Influence of molecular weight and degree of crosslinking on the specific volume and glass temperature of polymers. *Journal of Polymer Science*. 1955;15(80):371–390. <https://doi.org/10.1002/pol.1955.120158006>

10. Askadskii AA. *Computational materials science of polymers*. United Kingdom: Cambridge International Science Publishing; 2003. 696 p.

11. Sommermeyer K, Cech F, Schossow R. Differences in chemical structures between waxy

maize- and potato starch-based hydroxyethyl starch volume therapeutics. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine*. 2007;9(3):127–133. <https://doi.org/10.1111/j.1778-428X.2007.00071.x>

12. Askadskii AA, Slonimskii GL, Matveev Yul, Korshak VV. Macromolecule packaging and glass transition temperature of polymers. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya A = Polymer Science. Series A*. 1976;18(9):2067–2074. (In Russian)

13. Matveev Yul, Plashchina IG. A dynamic model of the effect of methyl resorcinol on the enzymatic activity of lysozyme. *Polymer Science. Series A*. 2011;53(5):390–396. <https://doi.org/10.1134/S0965545X11050063>

14. Matveev Yul, Askadskii AA. Calculation of the temperature of polymer transition into the viscous flow state. *Vysokomolekulyarnye soedineniya. Seriya A = Polymer Science. Series A*. 1993;35(1):63–67. (In Russian)

15. Askadskii AA, Kovriga OV. Effect of branching on the physical characteristics of polymers. *Polymer Science U.S.S.R.* 1991;33(9):1891–1831. [https://doi.org/10.1016/0032-3950\(91\)90019-M](https://doi.org/10.1016/0032-3950(91)90019-M)

16. Papakhin AA, Lukin ND, Ananskikh VV, Borodina ZM. Modern trends in starch hydrolysis technology. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 2020;34(12):84–89. (In Russian) <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2020-11214>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Матвеев Юрий Игнатьевич,

к.ф.-м.н., старший научный сотрудник,
Институт биохимической физики
им. Н.М. Эммануэля РАН,
117997, г. Москва, ул. Косыгина, 4,
Российская Федерация,
e-mail: yu.matveev@mail.ru

Аверьянова Елена Витальевна,

к.х.н., доцент, доцент кафедры биотехнологии,
Бийский технологический институт (филиал)
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный
технический университет им. И.И. Ползунова»,
659305, г. Бийск, ул. им. Героя Советского
Союза Трофимова, 27,
Российская Федерация,
✉ e-mail: averianova.ev@bti.secna.ru

Заявленный вклад авторов

Авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 09.02.2021.
Одобрена после рецензирования 16.04.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yuri I. Matveev,

Cand. Sci. (Physics and Mathematics),
Senior Scientist,
N.M. Emanuel Institute of Biochemical
Physics RAS,
4, Kosygin St., Moscow, 117997,
Russian Federation,
e-mail: yu.matveev@mail.ru

Elena V. Averyanova,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Department of Biotechnology,
Biysk Technological Institute (branch)
of the Altay State Technical University,
27, Geroi Sovetskogo Soyuza Trofimov St.,
Biysk, 659305,
Russian Federation,
✉ e-mail: averianova.ev@bti.secna.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

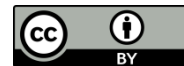
*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 09.02.2021.
Approved after reviewing 16.04.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 577.29

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-251-259>



Исследование роли фоторецепторов у *Arabidopsis thaliana* в регуляции процесса state transitions

© В.И. Бельков*, К.Е. Белогуб**, Е.Ю. Гарник*,
В.И. Тарасенко*, Ю.М. Константинов***

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

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

Резюме: Первичное построение фотосинтетического аппарата растений происходит в процессе фотоморфогенеза. Важнейшую роль в инициации и регуляции фотоморфогенеза играют белки-фоторецепторы красного/дальнекрасного (фитохромы) и синего (криптохромы) света. Возбужденные молекулы фитохромов и криптохромов способны взаимодействовать с транскрипционными факторами, изменяя экспрессию ядерных генов, кодирующих белки фотосинтетического аппарата растений. Поскольку свет является непостоянным, варибельным фактором, растения выработали соответствующие адаптационные механизмы, в частности, для защиты своего фотосинтетического аппарата. Механизм state transitions обеспечивает быструю адаптацию фотосинтетического аппарата, направленную на повышение эффективности адсорбции света при имеющихся условиях освещенности, и предотвращение усиленной генерации активных форм кислорода в хлоропластах, способной приводить к фотоокислению и даже гибели клеток. Цель данной работы – выявить роль фоторецепторов – фитохромов А и В, а также криптохромов 1 и 2 в регуляции процесса state transitions у модельного растения *Arabidopsis thaliana*. В качестве исследуемых объектов использовали мутанты арабидопсиса, несущие дефекты по генам фитохромов А и В, криптохромов 1 и 2. В качестве основного метода исследования был использован «голубой нативный» электрофорез в полиакриламидном геле, который позволяет визуализировать state transitions. В ходе исследований было установлено, что данные фоторецепторы не оказывают прямого влияния на редокс-регуляцию механизма state transitions у арабидопсиса. По-видимому, роль этих фоторецепторов в защите фотосинтетического аппарата от избыточной освещенности заключается не в регуляции state transitions, а реализуется более опосредованно, через регуляцию содержания хлорофиллов, каротиноидов и компонентов антиоксидантной системы.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, фитохромы, криптохромы, белки светособирающего комплекса, фотосинтетический аппарат

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00800. В работе использовано оборудование ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН (г. Иркутск). Авторы благодарны М.В. Кулинченко, к.б.н., старшему научному сотруднику лаборатории генетической инженерии растений СИФИБР СО РАН, за консультации при выполнении методической части работы.

Для цитирования: Бельков В.И., Белогуб К.Е., Гарник Е.Ю., Тарасенко В.И., Константинов Ю.М. Исследование роли фоторецепторов у *Arabidopsis thaliana* в регуляции процесса state transitions. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 2. С. 251–259. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-251-269>

The role of *Arabidopsis thaliana* photoreceptors in regulating the process of state transitions

Vadim I. Belkov*, Kristina E. Belogub**, Elena Yu. Garnik*,
Vladislav I. Tarasenko*, Yuri M. Konstantinov***

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

** Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

Abstract: The initial formation of the photosynthetic apparatus in plants occurs during photomorphogenesis. The red/far-red (phytochromes) and blue (cryptochrome) light protein-photoreceptors play the most important role in photomorphogenesis initiation and regulation. The excited phytochrome and cryptochrome molecules can interact with transcription factors, changing the expression of nuclear genes, which encode the proteins of the plant photosynthetic apparatus. Since light is a variable factor, plants have developed appropriate adaptation mechanisms, including their photosynthetic apparatus protection. The mechanism of state transitions ensures a rapid adaptation of the photosynthetic apparatus. This adaptation mechanism increases the adsorption efficiency under current light conditions and prevents intensive generation of active forms of oxygen in chloroplasts, which leads to photo-oxidation and even cell death. This work aims to determine the role of photoreceptors – phytochromes A and B, as well as cryptochrome 1 and 2 – in regulating the process of state transitions in the *Arabidopsis thaliana* model plant. *Arabidopsis* mutants with the defects on A and B phytochromes and cryptochrome 1 and 2 genes were used as the research objects. The blue native electrophoresis in polyacrylamide gel was used to visualise state transitions. It was found that these photoreceptors had no direct effect on the redox-regulation of the state transitions mechanism in *Arabidopsis*. Presumably, these photoreceptors protect the photosynthetic apparatus from excessive light not by regulating the state transitions but indirectly, through regulating the chlorophyll, carotenoid and antioxidant components content.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, phytochromes, cryptochrome, light-harvesting complex protein, photosynthetic apparatus

Acknowledgement: This work was supported by the RFBR no. 18-34-00800. Equipment of the Bioanalitika Center for Collective Use, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, was used in this study. The authors are grateful to Senior Researcher of Plant Genetic Engineering Laboratory, Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS M.V. Koulinchenko for consultations when performing the methodological part of the work.

For citation: Belkov VI, Belogub KE, Garnik EYu, Tarasenko VI, Konstantinov YuM. The role of *Arabidopsis thaliana* photoreceptors in regulating the process of state transitions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):251–259. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-251-259>

ВВЕДЕНИЕ

Свет является наиболее широко изученным абиотическим фактором, влияющим на организм растений. На ранних этапах жизни растений он стимулирует прорастание семян и запускает процессы роста и развития, инициирует фотоморфогенез [1]. Фотоморфогенез инициируется регуляторными сигналами, которые опосредуются белками-фоторецепторами. Фоторецепторы растений представляют собой белковые молекулы, ассоциированные с хромофорами (фитохромобилин – для фитохромов, и флавинаденидинуклеотид – для криптохромов). Когда хромофор воспринимает квант света соответствующей длины волны, конформация белковой части фоторецептора изменяется, что приводит к активации сети регуляторных сигналов внутри клеток. При действии на растения красного света фотоактивированные фитохромы А и В типа переходят в активную форму и транспортируются в ядро, где ингибируют транскрипционные факторы-репрессоры фотоморфогенеза – преимущественно белки семейства PIF (*phytochrome interaction factors*) [2]. Криптохромы дополняют функции фитохромов. Локализованные в ядре криптохромы 1 и 2 возбуждаются синим светом и подавляют транскрипционные факторы, репрессирующие экспрессию генов, продукты которых активно участвуют в фотоморфогенезе (например, HY5 и CO (запускает цветение)). Происходит накопление

белка HY5, который вызывает «выключение» убиквитин-лигазного комплекса CUL4-DDB1 E3, деактивирующего фитохромы А и В. Таким образом, без активированных криптохромов происходит репрессия фотоморфогенеза [3, 4].

На стадии взрослого растения фоторецепторы участвуют в регуляции процессов цветения, синдрома избегания тени, регуляции циркадных ритмов и др. Функционирование электрон-транспортной цепи хлоропластов (хлЭТЦ) неизбежно приводит к генерации активных форм кислорода, в результате чего может произойти повреждение этих органелл с последующим запуском программируемой гибели клеток. Для защиты своего фотосинтетического аппарата от фотодеструкции растения способны формировать долгосрочные (long-term) и краткосрочные (short-term) механизмы защиты. Долгосрочные адаптационные процессы инициируются после нескольких дней изменения освещенности и приводят к качественным изменениям белкового состава мембран тилакоидов, а также количества хлорофиллов и каротиноидов [5] через изменение экспрессии соответствующих генов. К краткосрочным механизмам относится процесс, описанный в литературе как *state transitions*, который проявляется через несколько минут после изменения условий освещенности [6]. Последовательное расположение фотосистем на тилакоидной мембране обеспечивает их эффективную

работу при условии, что они транспортируют возбужденные электроны без возникновения перенапряжения участков хлЭТЦ. Однако в естественных условиях часто возникает преобладание активности одной фотосистемы над другой, что и приводит к дисбалансу в скорости потока электронов по хлЭТЦ, вызывая угрозу фотоокисления переносчиков электронов и самих фотосистем. *State transitions* – это процесс обратимого взаимодействия мобильного пула белков внешних антенн светособирающего комплекса II (*light-harvesting complex II*, LHCII) с одной из фотосистем в результате перемещения белков LHCII.

Процесс *state transitions* можно разделить на два этапа – *состояние 1* и *состояние 2*. При *состоянии 1*, когда фотосистема II (ФСII) более активно улавливает кванты света, чем фотосистема (ФСI), пул пластохинонов становится восстановленным. В результате возникает редокс-сигнал, который передается на мембраносвязанную протеинкиназу STN7 (*state transitions 7*), которая затем фосфорилирует белки внешней антенны LHCII, связанной с ФСII [7]. Часть этой антенны отсоединяется от ФСII и переносится на ФСI, повышая ее способность к светоабсорбции (*состояние 2*), тем самым способствуя более равномерному распределению потока электронов по хлЭТЦ. В результате формируется *state transitions*-суперкомплекс ФСI-LHCII. Как только пул пластохинонов возвращается в окисленное состояние и STN7 деактивируется, суперкомплекс ФСI-LHCII распадается под действием протеинфосфатазы TAP38 (*thylakoid-associated phosphatase 38*), что приводит к возвращению системы к *состоянию 1* и взаимодействию LHCII с ФСII. Переключение между состояниями процесса *state transitions* может быть вызвано действием на растения ингибитора 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевины (DCMU, вызывает *состояние 1* на свету) или вследствие экспозиции растений на свету с длиной волны, специфически активирующей ФСI (дальнекрасный спектр) или ФСII (синий и красный спектр) [8, 9].

Имеются сообщения о возможном участии фоторецепторов в поддержании защиты фотосинтетического аппарата растений при действии ультрафиолета. Ультрафиолет вызывает усиленную генерацию активных форм кислорода, что приводит к повреждениям фотосинтетического аппарата растений. Криптохромы активируются при действии ультрафиолета А (320–400 нм) и могут играть роль в защитном ответе, однако механизм действия до конца не исследован [10]. По данным, представленным в работе В.Д. Креславского с соавторами, фитохромы А и В могут участвовать в защите фотосинтетического аппарата от ультрафиолета В (280–320 нм) [11]. В работе А.Ю. Худяковой с соавторами представлены результаты исследования растений линии двойного мутанта *phyAphyB* арабидопсиса, которые

имеют дефекты генов, кодирующих фитохромы А и В. Было показано, что в контрольных условиях (белый свет) большинство параметров фотосинтеза (F_v/F_m , F_v/F_0 , D_1/RC , ABS/RC , PI_{ABS}) у растений дикого типа и мутантов *phyAphyB* не различались. Эти мутанты имели пониженное содержание фотосинтетических и ультрафиолет-абсорбирующих пигментов, а также сниженное значение скорости фотосинтеза P_n [12]. По-видимому, фитохромы С, D и Е, а также криптохромы поддерживают функциональную активность фотосинтетического аппарата у этих мутантов при белом свете. После 30-минутной экспозиции в присутствии ультрафиолета В у двойных мутантов *phyAphyB* отмечено ухудшение показателей активности ФСII в большей степени, чем у линии дикого типа, что указывает на роль фитохромов А и В в защите фотосинтетического аппарата от фотоокисления. Аналогичную тенденцию к понижению функциональной активности ФСII у двойного мутанта *phyAphyB* наблюдали после экспозиции растений при красном свете (660 нм), что объяснили фотоингибированием фотосинтетического аппарата вследствие отсутствия активности фитохромов и криптохромов (криптохромы не активируются при красном свете) [12].

Повышение устойчивости растений к определенным стрессовым факторам может достигаться после накопления физиологически активной формы фитохрома [4]. Следствием этого накопления является активация антиоксидантных ферментов – каталазы и пероксидазы, а также стимуляция синтеза низкомолекулярных оксидантов – каротиноидов и флавоноидов. Таким образом, повышение антиоксидантной активности является одной из защитных реакций растений, которая возникает в ответ на действие красного света на фотосинтетический аппарат. В результате фоторецепторы (преимущественно фитохромы В) выступают не только в качестве светулавливающих молекул, но и компонентов антиоксидантной системы [11].

Остается неизученным вопрос о роли фоторецепторов в регуляции *state transitions* как механизма краткосрочной адаптации фотосинтетического аппарата к изменениям освещенности. Поскольку нет никаких данных об особенностях *state transitions* у мутантов по фитохромам А и В (*phyA*, *phyB*), а также криптохромам 1 и 2 (*cry1*, *cry2*), представляет интерес исследование условий формирования суперкомплекса ФСI-LHCII у этих мутантов в разных условиях освещенности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования и условия экспериментов. Семена *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. экотипа *Landsberg erecta* (*Ler*), а также гомозиготных линий мутантов по генам фитохромов А и В (*phyA-201*, локус AT1G09570 (далее *phyA*);

phyB-9, локус AT2G18790 (далее *phyB*)), криптохромов 1 и 2 (*hy4-2.23N*, локус AT4G08920 (далее *cry1*); *cry2-1*, локус AT1G04400 (далее *cry2*)) и *state transition7* (*stn7-1*, локус AT1G68830 (далее *stn7*)) были получены из Центра биологических ресурсов арабидопсиса (Государственный университет Огайо, США).

Семена стерилизовали в растворе, содержащем 70% этанола и 0,05% Triton X-100, в течение 8 мин, трижды промывали стерильной водой и выращивали стерильно на чашках Петри. Питательная среда содержала: минеральные соли (Murashige, Skoog, 1962) – половинный состав; фитогель («Sigma-Aldrich», США) – 0,8%; сахароза («Helicon», Россия) – 2%. После стратификации при 4 °С в течение трех суток чашки устанавливали в вертикальном положении и выращивали растения 20 суток при температуре 23 °С при освещенности 120 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ и длине светового дня 16 ч. Эксперименты проводили на 21-й день после стратификации.

Растения арабидопсиса линий экотипа *Ler* и мутантов *phyA*, *phyB*, *cry1*, *cry2* и *stn7* экспонировали при белом свете (120 мкмоль·м⁻²·с⁻¹) 4 ч, после чего помещали в темноту или под свет разного спектрального состава на 1 ч. В качестве источников освещения использовали светодиоды SMD-5050 («Рубикон», Россия) синего (465 нм), красного (630 нм) и дальнего красного (740 нм) света, а также лампы дневного света Philips TL-D 36W/54-765, цветовая температура – 6200 К (белый свет). В экспериментах с применением 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевины (DCMU) («Sigma-Aldrich», Германия) растения выдерживали 4 ч при белом свете, после чего обрабатывали 20 мкМ раствором DCMU и выдерживали при белом, красном или синем свете 2 ч. Все эксперименты были проведены не менее чем в трех биологических повторностях.

Выделение тилакоидов. Навеску листьев 180–200 мг растирали в охлажденной на льду ступке с 2 мл буфера СВ (сорбитол – 400 мМ, EDTA – 10 мМ, NaHCO₃ – 10 мМ, Hepes – 40 мМ, MgCl₂ – 5 мМ в присутствии 10 мМ NaF), pH – 7,8 [13, 14]. Затем фильтровали через 4 слоя ткани Miracloth (Calbiochem, Канада) и центрифугировали в течение 7 мин («Eppendorf», Германия) при 500 g. Супернатант сливали, ресуспендировали осадок в 500 мкл буфера СВ. Образцы хранили при -80 °С.

Солюбилизация мембран тилакоидов дигитонином. Солюбилизацию мембран проводили согласно методике, представленной в работе [14]. Биоматериал солюбилизировали в 100 мл буфера (5 мМ NaCl, 2 мМ аминокaproновой кислоты, 1 мМ ЭДТА, 1,5% дигитонина), инкубировали на льду в течение 30 мин, периодически аккуратно перемешивая, затем центрифугировали («Eppendorf», Германия) в течение 30 мин при 16100 g. В супернатант, обогащенный пластид-

ными комплексами, добавляли 5%-й (в/о) раствор красителя Serva Blue G в соотношении 1:4.

«Голубой нативный» электрофорез в полиакриламидном геле (BN-PAGE). В качестве разделяющего геля использовали линейный градиент, 5–16% акриламида, концентрирующий гель содержал 4% акриламида. Состав катодного буфера в электрофоретической камере: 50 мМ трицин, 15 мМ бис-трис, 0,02% Кумасси G-250, pH = 7,0; анодного – 50 мМ бис-трис, pH = 7,0 [15]. Солюбилизированная проба содержала 15–20 мкг хлорофиллов. Содержание хлорофиллов оценивали согласно [16]. Электрофоретическая миграция комплексов проходила при 4 °С до вхождения комплексов в разделяющий гель при 60 В, затем 6 ч – при 150 В. По окончании электрофореза гель фиксировали в 13%-й трихлоруксусной кислоте в течение 40 мин. Затем гель окрашивали в растворе, содержащем 5%-й раствор Serva Blue G в 10%-й уксусной кислоте. Отмывку от красителя проводили в растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 12,5% изопропилового спирта.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для подтверждения локализации суперкомплекса ФСII-LHCII на гелях, полученных методом BN-PAGE, использовали растения линии дикого типа *Ler* и мутанта *stn7* в качестве отрицательного контроля. Этот инсерционный мутант по гену протеинкиназы STN7 лишен возможности формировать суперкомплекс ФСII-LHCII. На электрофореграмме (рис. 1) показано, что после экспозиции при белом свете у растений линии *Ler* (трек № 2) отмечается формирование банды, который соответствует суперкомплексу ФСII-LHCII, образуемому в *состоянии 2*, согласно литературным данным [17]. В то же время после экспозиции в темноте формирование этого банды не наблюдается (трек № 1), что указывает на возвращение *state transitions* в *состояние 1*. У растений линии *stn7* отмечается отсутствие банды как при белом свете, так и в темноте (треки № 4 и № 3).

На рис. 2 и 3 представлены электрофореграммы, отображающие формирование суперкомплекса ФСII-LHCII у мутантных линий *phyA*, *phyB*, *cry1* и *cry2* в сравнении с линией *Ler* после 1 ч экспозиции под синим, красным и дальнекрасным светом. У растений контрольной линии *Ler* происходит сохранение суперкомплекса под действием синего и красного спектра света (*состояние 2*), и отмечается его расформирование в присутствии дальнекрасного света (*состояние 1*). У исследуемых мутантов фитохромов и криптохромов наблюдается *состояние 2* при синем и красном свете и *состояние 1* – при дальнекрасном, аналогично контрольным растениям линии *Ler*. Это позволяет предположить отсутствие прямой роли сигналов с участием

данных фоторецепторов в регуляции краткосрочной адаптации в виде процесса *state transitions*.

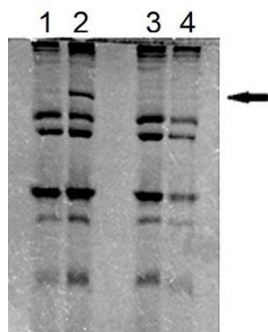


Рис. 1. Визуализация суперкомплекса ФCI-LHCII у линий экотипа *Ler* и мутанта *stn7* при белом свете: 1 – *Ler*, экспозиция 1 ч в темноте; 2 – *Ler* при белом свете; 3 – *stn7*, экспозиция – 1 ч в темноте; 4 – *stn7* при белом свете (стрелкой обозначено положение суперкомплекса ФCI-LHCII, наличие этого суперкомплекса означает *состояние 2*)

Fig. 1. Visualization of the PSI-LHCII supercomplex in *Ler* ecotype and *stn7* mutant plants in white light: 1 – *Ler*, 1 hour of the dark; 2 – *Ler*, white light exposition; 3 – *stn7*, 1 hour of the dark; 4 – *stn7*, white light exposition (the arrow indicates the position of the PSI-LHCII supercomplex, the presence of this supercomplex indicates *State 2*)

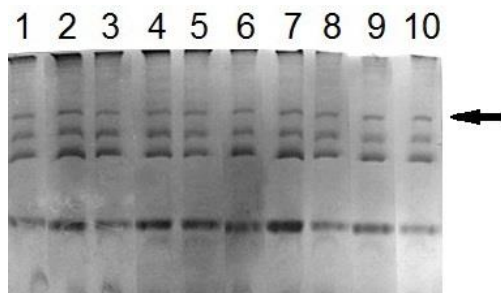


Рис. 2. Визуализация суперкомплекса ФCI-LHCII у линий *Ler*, *phyA*, *phyB*, *cry1* и *cry2* после экспозиции при синем или красном свете: 1 – *Ler*, красный свет; 2 – *phyA*, красный свет; 3 – *phyB*, красный свет; 4 – *cry1*, красный свет; 5 – *cry2*, красный свет; 6 – *Ler*, синий свет; 7 – *phyA*, синий свет; 8 – *phyB*, синий свет; 9 – *cry1*, синий свет; 10 – *cry2*, синий свет. Время экспозиции – 1 ч (стрелкой обозначено положение суперкомплекса ФCI-LHCII, наличие этого суперкомплекса означает *состояние 2*)

Fig. 2. Visualization of the PSI-LHCII supercomplex in *Ler*, *phyA*, *phyB*, *cry1* and *cry2* plants after exposure to blue or red light: 1 – *Ler*, red light; 2 – *phyA*, red light; 3 – *phyB*, red light; 4 – *cry1*, red light; 5 – *cry2*, red light; 6 – *Ler*, blue light; 7 – *phyA*, blue light; 8 – *phyB*, blue light; 9 – *cry1*, blue light; 10 – *cry2*, blue light. The exposure time is 1 hour (the arrow indicates the position of the PSI-LHCII supercomplex, the presence of this supercomplex indicates *State 2*)

Для подтверждения полученного результата растения линий *Ler*, *phyA*, *phyB*, *cry1* и *cry2*, выдержанные при белом свете в течение 4 ч, обрабатывали ингибитором DCMU и экспонировали 2 ч при белом, синем или красном свете (рис. 4).

Отмечен переход в *состояние 1* у всех образцов, обработанных ингибитором DCMU, что указывает на сохранение функционирования ТАР38 при редокс-регуляции *state transitions* у исследуемых мутантов.

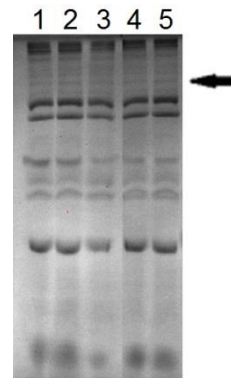


Рис. 3. Визуализация суперкомплекса ФCI-LHCII у линий *Ler*, *phyA*, *phyB*, *cry1* и *cry2* после экспозиции при дальнекрасном свете: 1 – *Ler*; 2 – *phyA*; 3 – *phyB*; 4 – *cry1*; 5 – *cry2*. Время экспозиции – 1 ч (стрелкой обозначено положение суперкомплекса ФCI-LHCII, наличие этого суперкомплекса означает *состояние 2*)

Fig. 3. Visualization of the PSI-LHCII supercomplex in *Ler*, *phyA*, *phyB*, *cry1* and *cry2* plants after exposure to far-red light: 1 – *Ler*; 2 – *phyA*; 3 – *phyB*; 4 – *cry1*; 5 – *cry2*. The exposure time is 1 hour (the arrow indicates the position of the PSI-LHCII supercomplex, the presence of this supercomplex indicates *State 2*)

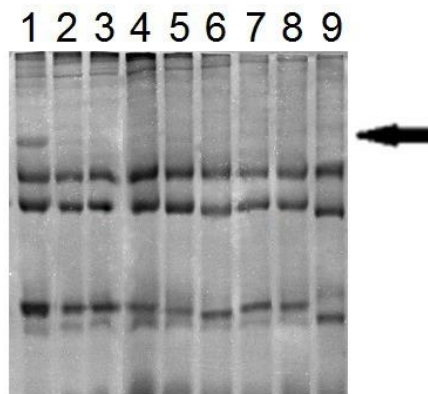


Рис. 4. Визуализация суперкомплекса ФCI-LHCII у линий *phyA*, *phyB*, *cry1* и *cry2* после обработки DCMU и экспозиции при синем или красном свете: 1 – *Ler*, контроль при белом свете, без обработки; 2 – *phyA*, синий свет; 3 – *phyB*, синий свет; 4 – *cry1*, синий свет; 5 – *cry2*, синий свет; 6 – *phyA*, красный свет; 7 – *phyB*, красный свет; 8 – *cry1*, красный свет; 9 – *cry2*, красный свет. Время экспозиции – 2 ч (стрелкой обозначено положение суперкомплекса ФCI-LHCII, наличие этого суперкомплекса означает *состояние 2*)

Fig. 4. Visualization of the PSI-LHCII supercomplex in *Ler*, *phyA*, *phyB*, *cry1* and *cry2* after DCMU treatment and exposure to blue or red light: 1 – *Ler*, white light control, no treatments; 2 – *phyA*, blue light; 3 – *phyB*, blue light; 4 – *cry1*, blue light; 5 – *cry2*, blue light; 6 – *phyA*, red light; 7 – *phyB*, red light; 8 – *cry1*, red light; 9 – *cry2*, red light. The exposure time is 2 hours (the arrow indicates the position of the PSI-LHCII supercomplex, the presence of this supercomplex indicates *State 2*)

Ранее были проведены исследования мутантов *phyA*, *phyB*, *cry1* и *cry2* в условиях долгосрочной адаптации фотосинтетического аппарата к изменению условий освещенности [18]. Растения выращивали при белом свете 10 суток, затем перемещали на свет, специфичный для ФС I или ФС II на 6 суток, после чего оценивали параметры фотосинтеза методом ПАМ-флюорометрии. Поскольку значимых различий между мутантами и растениями дикого типа в этих условиях зафиксировано не было, то авторы работы сделали вывод, что фитохромы и криптохромы напрямую не причастны к возникновению и передаче сигналов, характерных для долгосрочных адаптационных процессов фотосинтетического аппарата. Однако роль фоторецепторов в формировании краткосрочных ответов ранее не исследовалась. Полученные в настоящей работе данные указывают на отсутствие прямого участия фитохромов А и В и криптохромов 1 и 2 в процессах краткосрочной адаптации фотосинтетического аппарата (*state transitions*) у растений. Влияние этих фоторецепторов на адаптацию фотосинтетиче-

ского аппарата к неоптимальным условиям освещенности [5] осуществляется, по-видимому, не специфически, а через универсальные механизмы, например, участие в антиоксидантной защите [19–21]. Мутации по фитохромам А или В и криптохромам 1 или 2 делают растения более подверженными действию стресс-факторов, снижают уровень хлорофиллов, каротиноидов, целостность хлоропластов при старении, а также усиливают окисление липидов [12, 22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследована роль фоторецепторов синего и красного света – криптохромов и фитохромов, в регуляции краткосрочной адаптации фотосинтетического аппарата у арабидопсиса методом BN-PAGE. Полученные данные указывают, что эти фоторецепторы не участвуют в регуляции *state transitions* под действием синего, красного или дальнего красного света. Полученные данные дополняют предыдущие исследования о роли фоторецепторов в долгосрочных адаптационных ответах [18].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Han X., Tohge T., Lalor P., Dockery P., Devaney N., Esteves-Ferreira A.A., et al. Phytochrome A and B regulate primary metabolism in *Arabidopsis* leaves in response to light // *Frontiers in Plant Science*. 2017. Vol. 8. P. 1394. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01394>
2. Paik I., Huq E. Plant photoreceptors: Multifunctional sensory proteins and their signaling networks // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2019. Vol. 92. P. 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.03.007>
3. Ma D., Li X., Guo Y., Chu J., Fang S., Yan C., et al. Cryptochrome 1 interacts with PIF4 to regulate high temperature-mediated hypocotyl elongation in response to blue light // *PNAS*. 2016. Vol. 113. Issue 1. P. 224–229. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511437113>
4. Kreslavski V.D., Los D.A., Schmitt F.-J., Zharmukhamedov S.K., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I. The impact of the phytochromes on photosynthetic processes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2018. Vol. 1859. Issue 5. P. 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.03.003>
5. Colombo M., Suorsa M., Rossi F., Ferreri R., Tadini L., Barbato R., et al. Photosynthesis control: an underrated short-term regulatory mechanism essential for plant viability // *Plant Signaling & Behavior*. 2016. Vol. 11. Issue 4. e1165382 (6 p.). <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1165382>
6. Dietzel L., Brautigam K., Pfannschmidt T. Photosynthetic acclimation: state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry–functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants // *FEBS Journal*. 2008. Vol. 275. Issue 6. P. 1080–1088. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06264.x>
7. Caffari S.A., Tibiletti T., Jennings R., Santabarbara S. A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning // *Current Protein and Peptide Science*. 2014. Vol. 15. Issue 4. P. 296–331. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140327102218>
8. Wunder T., Liu Q., Aseeva E., Bonardi V., Leister D., Pribil M. Control of STN7 transcript abundance and transient STN7 dimerisation are involved in the regulation of STN7 activity // *Planta*. 2013. Vol. 237. Issue 2. P. 541–558. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1775-y>
9. Rochaix J.-D., Lemeille S., Shapiguzov A., Samol I., Fucile G., Willig A., et al. Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment // *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*. 2012. Vol. 367. Issue 1608. P. 3466–3474. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0064>
10. Verdaguer D., Jansen M.A.K., Llorens L., Morales L.O., Neugart S. UV-A radiation effects on higher plants: exploring the known unknown // *Plant Science*. 2017. Vol. 255. P. 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.11.014>
11. Kreslavski V.D., Lyubimov V.Yu., Shirshikova G.N., Shmarev A.N., Kosobryukhov A.A., Schmitt F.-J., et al. Preillumination of lettuce seedlings with red light enhances the resistance of photosynthetic apparatus to UV-A // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013. Vol. 122. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.02.016>
12. Khudyakova A.Yu., Kreslavski V.D., Shirshikova G.N., Zarmukhamedov S.K., Kosobryukhov

A.A., Allakhverdiev S.I. Resistance of *Arabidopsis thaliana* L. photosynthetic apparatus to UV-B is reduced by deficit of phytochromes B and A // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2017. Vol. 169. P. 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.photobiol.2017.02.024>

13. Aronsson H., Jarvis P. A simple method for isolating import-competent *Arabidopsis* chloroplasts // FEBS Letters. 2002. Vol. 529. Issue 2-3. P. 215–220. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03342-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03342-2)

14. Pribil M., Pesaresi P., Hertle A., Barbato R., Leister D. Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCII dephosphorylation and thylakoid electron flow // PLoS Biology. 2010. Vol. 8. Issue 1. e1000288 (12 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000288>

15. Nijtmans G.J., Henderson N.S., Holt I.J. Blue native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes // Methods. 2002. Vol. 26. Issue 4. P. 327–334. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00038-5)

16. Ni Z., Kim E.-D., Ha M., Lackey E., Liu J., Zhang Y., et al. Altered circadian Rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids // Nature. 2009. Vol. 457. Issue 7227. P. 327–331. <https://doi.org/10.1038/nature07523>

17. Wunder T., Liu Q., Aseeva E., Bonardi V., Leister D., Pribil M. Control of STN7 transcript abundance and transient STN7 dimerisation are involved in the regulation of STN7 activity // Planta. 2013. Vol. 237. P. 541–558. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1775-y>

s00425-012-1775-y

18. Fey V., Wagner R., Brautigam K., Wirtz M., Hell R., Dietzmann A., et al. Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana* // The Journal of Biological Chemistry. 2005. Vol. 280. Issue 7. P. 5318–5328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406358200>

19. Carvalho R.F., Campos M.L., Azevedo R.A. The role of phytochrome in stress tolerance // Journal of Integrative Plant Biology. 2011. Vol. 53. Issue 12. P. 920–929. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01081.x>

20. Kreslavski V.D., Kosobryukhov A.A., Schmitt F.-J., Semenova G.A., Shirshikova G.N., Khudyakova A.Y., et al. Photochemical activity and the structure of chloroplasts in *Arabidopsis thaliana* L. mutants deficient in phytochrome A and B // Protoplasma. 2017. Vol. 254. Issue 3. P. 1283–1293. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1020-9>

21. Casal J.J. Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade // Annual Review of Plant Biology. 2013. Vol. 64. P. 403–427. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120221>

22. Rusaczek A., Czarnocka W., Kacprzak S., Witon D., Slesak I., Szechynska-Hebda M., et al. Role of phytochromes A and B in the regulation of cell death and acclimatory responses to UV stress in *Arabidopsis thaliana* // Journal of Experimental Botany. 2015. Vol. 66. Issue 21. P. 6679–6695. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv375>

REFERENCE

1. Han X, Tohge T, Lalor P, Dockery P, Devaney N, Esteves-Ferreira AA, et al. Phytochrome A and B regulate primary metabolism in *Arabidopsis* leaves in response to light. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:1394. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01394>

2. Paik I, Huq E. Plant photoreceptors: Multifunctional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2019;92:114–121. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2019.03.007>

3. Ma D, Li X, Guo Y, Chu J, Fang S, Yan C, et al. Cryptochrome 1 interacts with PIF4 to regulate high temperature-mediated hypocotyl elongation in response to blue light. *PNAS*. 2016;113(1):224–229. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511437113>

4. Kreslavski VD, Los DA, Schmitt F.-J., Zharmukhamedov SK, Kuznetsov VV, Allakhverdiev SI. The impact of the phytochromes on photosynthetic processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2018;1859(5):400–408. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.03.003>

5. Colombo M, Suorsa M, Rossi F, Ferreri R, Tadini L, Barbato R, et al. Photosynthesis control: an underrated short-term regulatory mechanism essential for plant viability. *Plant Signaling & Behavior*. 2016;11(4):e1165382 (6 p.). <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1165382>

10.1080/15592324.2016.1165382

6. Dietzel L, Brautigam K, Pfannschmidt T. Photosynthetic acclimation: state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry–functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants. *FEBS Journal*. 2008; 275(6):1080–1088. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06264.x>

7. Caffari SA, Tibiletti T, Jennings R, Santabarbara S. A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning. *Current Protein and Peptide Science*. 2014;15(4):296–331. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140327102218>

8. Wunder T, Liu Q, Aseeva E, Bonardi V, Leister D, Pribil M. Control of STN7 transcript abundance and transient STN7 dimerisation are involved in the regulation of STN7 activity. *Planta*. 2013;237(2):541–558. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1775-y>

9. Rochaix J-D, Lemeille S, Shapiguzov A, Samol I, Fucile G, Willig A, et al. Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*. 2012;367(1608):3466–3474. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0064>

11. Kreslavski VD, Lyubimov VYu, Shirshikova GN, Shmarev AN, Kosobryukhov AA, Schmitt FJ, et

al. Preillumination of lettuce seedlings with red light enhances the resistance of photosynthetic apparatus to UV-A. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013;122:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.02.016>

12. Khudyakova AYu, Kreslavski VD, Shirshikova GN, Zarmukhamedov SK, Kosobryukhov AA, Allakhverdiev SI. Resistance of *Arabidopsis thaliana* L. photosynthetic apparatus to UV-B is reduced by deficit of phytochromes B and A. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017;169:41–46. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.02.024>

13. Aronsson H, Jarvis P. A simple method for isolating import-competent *Arabidopsis* chloroplasts. *FEBS Letters*. 2002;529(2-3):215–220. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03342-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03342-2)

14. Pribil M, Pesaresi P, Hertle A, Barbato R, Leister D. Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCII dephosphorylation and thylakoid electron flow. *PLoS Biology*. 2010;8(1):e1000288 (12 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000288>

15. Nijtmans GJ, Henderson NS, Holt IJ. Blue native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods*. 2002;26(4):327–334. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00038-5)

16. Ni Z, Kim E-D, Ha M, Lackey E, Liu J, Zhang Y, et al. Altered circadian Rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature*. 2009;457(7227):327–331. <https://doi.org/10.1038/nature07523>

17. Wunder T, Liu Q, Aseeva E, Bonardi V, Leister D, Pribil M. Control of STN7 transcript abundance and transient STN7 dimerisation are involved in the regulation of STN7 activity. *Planta*. 2013;237:541–558. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1775-y>

18. Fey V, Wagner R, Brautigam K, Wirtz M, Hell R, Dietzmann A, et al. Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(7):5318–5328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406358200>

19. Carvalho RF, Campos ML, Azevedo RA. The role of phytochrome in stress tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2011;53(12):920–929. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01081.x>

20. Kreslavski VD, Kosobryukhov AA, Schmitt F-J, Semenova GA, Shirshikova GN, Khudyakova AY, et al. Photochemical activity and the structure of chloroplasts in *Arabidopsis thaliana* L. mutants deficient in phytochrome A and B. *Protoplasma*. 2017;254(3):1283–1293. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1020-9>

21. Casal JJ. Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annual Review of Plant Biology*. 2013;64:403–427. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120221>

22. Rusaczonok A, Czarnocka W, Kacprzak S, Witon D, Slesak I, Szechynska-Hebda M, et al. Role of phytochromes A and B in the regulation of cell death and acclimatory responses to UV stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(21):6679–6695. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv375>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бельков Вадим Игоревич,

к.б.н., младший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
✉ e-mail: anvad.irk@rambler.ru

Белогуб Кристина Евгеньевна,

студентка,
Иркутский государственный университет,
664033, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: kristina200298@yandex.ru

Гарник Елена Юрьевна,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: elga74@yandex.ru

Тарасенко Владислав Игоревич,

к.б.н., старший научный сотрудник,
Сибирский институт физиологии

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Vadim I. Belkov,

Cand. Sci. (Biology), Junior Researcher,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ e-mail: anvad.irk@rambler.ru

Kristina E. Belogub,

Student,
Irkutsk State University;
1, K. Marx St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: kristina200298@yandex.ru

Elena Yu. Garnik,

Cand. Sci. (Biology), Senior Scientist,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: elga74@yandex.ru

Vladislav I. Tarasenko,

Cand. Sci. (Biology), Senior Scientist,
Siberian Institute of Plant Physiology

и биохимии растений СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
e-mail: vslav@inbox.ru

Константинов Юрий Михайлович,
д.б.н., профессор, заведующий лабораторией
генетической инженерии растений,
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН;
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
Российская Федерация,
профессор,
Иркутский государственный университет,
664033, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта ин-
тересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 13.08.2020.
Одобрена после рецензирования 19.10.2020.
Принята к публикации 31.05.2021.*

and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: vslav@inbox.ru

Yuri M. Konstantinov,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Head of the laboratory
of Plant Genetic Engineering,
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS,
132, Lermontov St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation;
Professor,
Irkutsk State University,
1, K. Marx St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and ap-
proved by all the co-authors.*

*The article was submitted 13.08.2020.
Approved after reviewing 19.10.2020.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 615.322:616-003.725

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-260-271>



Исследование показателей безопасности экстрактов каллусных культур *Pulmonaria officinalis* и их фитохимического состава на наличие биологически активных веществ с потенциальными геропротекторными свойствами

© Л.С. Дышлюк, М.Ю. Дроздова, А.И. Лосева

Кемеровский государственный университет,
г. Кемерово, Российская Федерация

Резюме: Старение является естественным и неизбежным процессом, сопровождающимся различными заболеваниями. Растение медуница лекарственная (*Pulmonaria officinalis*) является источником биологически активных веществ, способных замедлять процессы старения и улучшать качество жизни людей. Каллусная культура данного растения может быть перспективным сырьем для создания нутрицевтиков. Однако состав медуницы лекарственной по наличию индивидуальных биологически активных веществ недостаточно изучен, особенно в отношении фенольных соединений с потенциальными геропротекторными свойствами. Проведено исследование фитохимического состава экстракта каллусных культур медуницы лекарственной на наличие биологически активных веществ с потенциальными геропротекторными свойствами и определены показатели его качества. Двукратную экстракцию каллусных культур *Pulmonaria officinalis* проводили на водяной бане с 70%-м этиловым спиртом. Определение показателей безопасности экстрактов проводили согласно требованиям фармакопейной статьи. К важным показателям качества экстрактов относили органолептические, физико-химические и микробиологические свойства. Продемонстрировано, что содержание тяжелых металлов, радионуклидов, сухой остаток, остаточное содержание спирта, а также органолептические показатели и микробиологическая чистота соответствуют нормативным документам. Фитохимический состав экстракта каллусных культур определяли методами высокоэффективной жидкостной и трехслойной хроматографии. Идентифицированы флавоноиды (рутин, изорамнетин, кверцетин), тритерпеновые сапонины и фенольные кислоты (p-кумаровая, феруловая, галловая, кофейная, розмариновая и хлорогеновая). Наличие тритерпенового сапонина, p-кумаровой, феруловой и галловой кислот обнаружено в экстракте каллусной культуры медуницы впервые. Количественный анализ биологически активных веществ показал, что содержание кофейной, розмариновой и хлорогеновой кислот в экстракте каллусной культуры является более высоким, чем содержание этих же веществ в экстрактах из наземных частей растения.

Ключевые слова: медуница лекарственная, каллусные культуры, биологически активные вещества, геропротекторы, фенольные кислоты, фитохимический состав, показатели безопасности

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект FZSR-2020-0006 «Скрининг биологически активных веществ растительного происхождения, обладающих геропротекторными свойствами, и разработка технологии получения нутрицевтиков, замедляющих старение»).

Для цитирования: Дышлюк Л.С., Дроздова М.Ю., Лосева А.И. Исследование показателей безопасности экстрактов каллусных культур *Pulmonaria officinalis* и их фитохимического состава на наличие биологически активных веществ с потенциальными геропротекторными свойствами. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 2. С. 260–271. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-260-271>

Study on safety profile in extracts of *Pulmonaria officinalis* callus cultures and their phytochemical composition for the presence bioactive substances with the potential geroprotective properties

Lyubov S. Dyshlyuk, Margarita Yu. Drozdova, Anna I. Loseva

Kemerovo State University,
Kemerovo, Russian Federation

Abstract: Ageing is a natural and inevitable process accompanied by different diseases. Medicinal lungwort (*Pulmonaria officinalis*) is a source of bioactive substances that can slow down ageing and improve the quality of human life. Callus culture of this plant can be a promising raw material to produce nutraceuticals. However, a composition of individual bioactive substances in medicinal lungwort has been studied insufficiently, particularly when it comes to phenolic compounds with potential geroprotective properties. We performed a study on the phytochemical composition of the callus cultures, extracted from the medicinal lungwort plant, for the presence of bioactive substances with the potential geroprotective properties and determined their quality profile. Twofold extraction of *Pulmonaria officinalis* callus cultures was carried out on a water bath with 70% ethyl alcohol. Determination of the safety profile of extracts was performed according to the requirements of the Pharmaceutical Norms and Regulations. Organoleptic, physicochemical and microbiological properties were considered important indicators of the quality of the extracts. It was demonstrated that the content of heavy metals, radionuclides, dry residue, residual alcohol content, as well as organoleptic characteristics and microbiological purity, comply with the regulatory documents. The phytochemical composition of the callus culture extract was determined by high-performance liquid chromatography and three-layer chromatography. The following flavonoids (rutin, isorhamnetin, quercetin), triterpenoid saponins and phenolic acids (*p*-coumaric, ferulic, gallic, caffeic, rosmarinic and chlorogenic) were identified. The presence of triterpenoid saponin, *p*-coumaric, ferulic and gallic acids is discovered in the extract of the lungwort callus culture for the first time. Quantitative analysis of bioactive substances showed that the content of caffeic, rosmarinic and chlorogenic acids in the callus culture extract is higher than that in the extracts from the aerial parts of the plant.

Keywords: medicinal lungwort, callus cultures, bioactive substances, geroprotectors, phenolic acids, phytochemical composition, safety profile

Acknowledgments: This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project FZSR-2020-0006 "Screening of biologically active substances of plant origin with geroprotective properties, and development of technology for obtaining nutraceuticals that slow down ageing").

For citation: Dyshlyuk LS, Drozdova MYu, Loseva AI. Study on safety profile in extracts of *Pulmonaria officinalis* callus cultures and their phytochemical composition for the presence bioactive substances with the potential geroprotective properties. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):260–271. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-260-271>

ВВЕДЕНИЕ

Процесс старения носит естественный и неизбежный характер. В организме с течением времени происходят необратимые повреждения органов, тканей и клеток. Старение – универсальный процесс, продолжающийся до самой смерти. Увеличение продолжительности жизни и замедление процесса старения привлекали внимание исследователей на протяжении всего времени существования человечества [1–3].

В мире непрерывно возрастает процент людей пожилого возраста. Предполагается, что к 2050 г. население старше 60 лет будет составлять около двух млрд человек, в то время как в 2015 г. таких людей было 900 млн [4, 5]. С одной стороны, наблюдается непрерывное увеличение продолжительности жизни населения, а с другой – отсутствие физических нагрузок, неправильное питание с высоким потреблением калорий приводят к различным метаболическим заболеваниям и таким расстройствам, как диабет, ожирение, сердечно-

сосудистые заболевания, которые ухудшают качество жизни людей [1, 6].

На молекулярном уровне процесс старения зависит от стабильности и целостности ДНК. Геном организма постоянно подвергается угрозам со стороны химических, физических и биологических экзогенных факторов. К эндогенным угрозам относятся: ошибки репликации ДНК, снижение ее способности к репарации; окислительный и ультрафиолетовый стрессы; спонтанные гидролитические реакции [4, 7]. Избыточное накопление активных форм кислорода и снижение активности ферментов, контролирующих радикалы, способствуют развитию различных нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера и Паркинсона [8, 9].

Самая распространенная причина деменции у пожилых людей – болезнь Альцгеймера. Предполагается, что к 2030 г. количество больных людей составит около 66 млн человек. Вторым по распространенности нейродегенеративным заболева-

нием является болезнь Паркинсона. Она поражает примерно 2% людей старше 65 лет [10, 11].

Профилактика возрастных заболеваний и замедление процессов старения является глобальной проблемой. Следовательно, возникает растущая потребность в создании новых нутрицевтиков с геропротекторными свойствами [5]. При разработке новых препаратов против старения предпочтение отдается ингредиентам из растительного сырья. Это связано прежде всего с более мягким воздействием и отсутствием побочных эффектов на живой организм. Нутрицевтики на растительной основе не вызывают привыкания и обладают широким спектром лечебного действия [12].

Лекарственные растения, произрастающие на территории Сибирского федерального округа (СФО), являются перспективным источником сырья для создания нутрицевтиков. Из растений можно выделять индивидуальные биологически активные вещества (БАВ), обладающие геропротекторными свойствами. К многочисленным диким растениям СФО относится медуница лекарственная (*Pulmonaria officinalis*).

Многолетнее травянистое растение *Pulmonaria officinalis* относится к семейству *Boraginaceae*. Традиционно его используют для лечения респираторных, бронхо-легочных заболеваний, заболеваний желудочно-кишечного тракта и почек, а также применяют как противоопухолевое средство [13, 14].

В экстрактах надземных частей *Pulmonaria officinalis* содержатся биологически активные комплексы и индивидуальные вещества, которые можно использовать для увеличения продолжительности и качества жизни. Полифенолы, фенольные кислоты, флавоноиды, проантоцианидины, витамин С ответственны за антиоксидантные и антирадикальные свойства растения [15]. Однако фитохимический состав медуницы лекарственной по наличию индивидуальных биоактивных веществ недостаточно изучен, особенно в отношении фенольных соединений.

В исследованиях М.А. Nawrył и других указывается на наличие хлорогеновой кислоты, акацетина, кверцетина, мирицетина, геспередина, апигенина и нарингенина в метанольном экстракте *Pulmonaria officinalis* [16]. На основании анализа также было сообщено, что розмариновая кислота являлась основным компонентом в водных и этанольных экстрактах медуницы. Кроме нее было обнаружено небольшое количество рутина и гиперозида [15].

Исследования Krzyzanowska-Kowalczyk J. и других показали, что экстракт медуницы лекарственной включает юннановую кислоту В. Это уникальное вещество, которое было выделено только из *Salvia yunnanensis*, является мощным геропротектором [17, 18]. Однако эти сообщения дают неполное представление о фитохимиче-

ских веществах, присутствующих в медунице лекарственной. Все данные о составе индивидуальных БАВ растения были получены в результате исследования надземных частей *Pulmonaria officinalis*, собранных в естественном местобитании. Фитохимический состав каллусных культур не исследовался.

Во всем мире для достижения терапевтических эффектов используются пищевые добавки на основе растений. Очевидно, что для промышленного производства биологически активных добавок (БАД) требуется большой объем растительного сырья, сбор которого с территории произрастания может привести к значительному уменьшению количества растений вплоть до полного исчезновения вида, что в целом негативно скажется на состоянии экосистем региона [19]. Поэтому предпочтение отдается использованию каллусных культур. При культивировании растений *in vitro* сырье для экстрактов можно получать круглый год. При этом можно добиваться выращивания «чистых» растений, не зараженных бактериями и вирусами, ведь для создания БАД необходимо учитывать не только фитохимический состав сырья, но и его безопасность.

При культивировании *Pulmonaria officinalis in vitro* образуются каллусные культуры, обогащенные БАВ, которые можно использовать для создания нутрицевтиков. Здесь также важно отсутствие негативного воздействия нутрицевтиков на организм [20].

Целью настоящей работы являлось исследование показателей безопасности экстрактов каллусных культур *P. officinalis* и их фитохимического состава на наличие биологически активных веществ с потенциальными геропротекторными свойствами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом изучения являлись каллусные культуры медуницы лекарственной, выращенной в условиях *in vitro* на твердых питательных средах. В минеральный и гормональный состав для культивирования каллусных культур медуницы лекарственной входили: макросоли MS 20x (50,00 мл), микросоли 20x MS (1,00 мл), Fe-ЭДТА (5,00 мл), сахароза (30,00 г), никотиновая кислота (0,50 мг), пиридоксин (0,50 мг), тиамин (0,10 мг), гидролизат казеина (500,00 мг), инозит (100,00 мг), кинетин (2,00 мг), 6-БАП (0,50 мг), НУК (3,00 мг), агар (20,00 г). Цикл выращивания культуры составил 5 недель.

Для получения экстрактов использовали 70%-й этиловый спирт. Каллусные культуры высушивали и измельчали в мельнице ЛЗМ-1М (Россия). Измельченное сырье просеивали через сито с диаметром пор 1 мм². Подготовленное сырье хранилось в темном помещении при комнатной температуре.

Мелкодисперсный порошок *Pulmonaria officinalis*

nal в количестве 3,0 г экстрагировали в 260 мл 70%-го этилового спирта в статических условиях. Экстрагирование каллусных культур осуществлялось на лабораторной водяной бане Экрос ПЭ-4310 (Экросхим, Россия) с обратным холодильником. Экстракцию проводили двукратно.

Продолжительность экстрагирования при 70%-й концентрации экстрагента каллусных культур медуницы лекарственной при температуре 30 °С составила: для образца № 1 – 2 ч; для образца № 2 – 4 ч; для образца № 3 – 6 ч.

Определение БАВ в экстракте каллусной культуры медуницы лекарственной осуществляли на стеклянной хроматографической колонке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием хроматографа Shimadzu LC-20AD, стальной колонки высокого давления диаметром 2,5 мм и длиной 250 мм с размером сорбента 2,5 мкм. Условия элюирования: скорость потока – 1 мл/мин, элюент – вода:метанол, 0,1%-ая трифторуксусная кислота с линейным градиентом от 40 до 90% метанола за 20 мин. Детектирование проводили при длине волны 254 нм.

Совместно с ВЭЖХ-анализом использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ). Путем применения ТСХ проводили анализ компонентного состава экстракта каллусных культур *Pulmonaria officinalis*. Исследование выполняли на пластинах Sorbfil ПТСХ-АФ-А и пластинах HPLC Silica gel 60 RP-18 (Merk) с последующей денситометрией ТСХ-пластины Sorbfil. Использовали денситометр с системой фотофиксации Sony (Handycam HDR-CX405) (ООО «ИМИД», Россия). Фотофиксацию осуществляли при длинах волн 254, 365 нм и в диапазоне видимого излучения после специфической дериватизации. Элюирование осуществляли в системе подвижной фазы: *n*-бутанол : уксусная кислота : вода (60 : 15 : 25). В качестве проявителя был использован 25%-й этанольный раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты. Идентификацию веществ в экстракте проводили, используя стандартные образцы рутина, изорамнетина, кверцетина, галловой, п-кумаровой, феруловой, кофейной, розмариновой, хлорогеновой кислот («Sigma–Aldrich», США).

Содержание тяжелых металлов в экстрактах

калусных культур определяли по ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»¹.

Содержание радионуклидов определяли по ОФС.1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратов»¹.

Органолептическим методом определяли цвет и запах экстракта. При необходимости отмечали наличие опалесценции, возможность образования осадка при хранении.

Для определения сухого остатка 5,0 мл жидкого экстракта медуницы лекарственной помещали в предварительно взвешенный бюкс. Далее проводили выпаривание экстракта на водяной бане и сушили 3 ч при температуре 102,5±2,5 °С. Сухой остаток охлаждали в эксикаторе в течение 30 мин и затем взвешивали.

Контролировали остаточное содержание спирта в соответствии с требованиями ОФС «Остаточные органические растворители»¹.

Микробиологическую чистоту определяли согласно ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота»¹.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

К необходимым исследованиям безопасности экстрактов относятся органолептические, физико-химические и микробиологические исследования. Экстракты по своим показателям безопасности должны отвечать нормативным документам¹. В табл. 1 приведены результаты исследования физико-химических свойств трех образцов экстрактов каллусных культур медуницы лекарственной, при этом каких-либо особенностей не обнаружено.

Результаты исследования физико-химических показателей экстрактов каллусных культур медуницы лекарственной соответствуют требованиям ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты» (см. табл. 1). Следовательно, извлеченные комплексы веществ можно использовать в дальнейших исследованиях при создании нутрицевтиков. Добавление экстрактов каллусных культур медуницы или извлеченных из них БАВ будет безопасно по исследованным параметрам.

Таблица 1. Физико-химические свойства экстрактов каллусных культур медуницы лекарственной (*Pulmonaria officinalis*)

Table 1. Physicochemical properties of *Pulmonaria officinalis* L. callus crops

| Образец | Цвет | Запах | Сухой остаток, % | | Остаточное содержание спирта, % |
|---------|---------------|-------------|------------------|-----------|---------------------------------|
| | | | норма | результат | |
| 1 | желтый | характерный | ≤ 5,00 | 3,86±0,07 | 68,00±0,48 |
| 2 | светло-желтый | | | 3,42±0,08 | 66,00±0,24 |
| 3 | зелено-желтый | | | 3,12±0,01 | 68,00±0,64 |

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2. 2015. [Электронный ресурс] // Федеральная электронная медицинская библиотека. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea13.php> (01.02.2021).

Используемое для производства нутрицевтиков сырье на основе лекарственных растений может быть загрязнено токсикантами, что является фактором риска для здоровья человека. Определение наличия в сырье тяжелых металлов – важный этап в разработке БАД на основе экстрактов лекарственных растений. От этого зависит качество и безопасность продукта.

Исследованные показатели безопасности экстрактов культуры медуницы по содержанию примесей тяжелых металлов: свинца (Pb), ртути (Hg), висмута (Bi), сурьмы (Sb), олова (Sn), кадмия (Cd), серебра (Ag), меди (Cu), молибдена (Mo), ванадия (V), рутения (Ru), платины (Pt), палладия (Pd), представлены в табл. 2.

Анализируя показатели, приведенные в табл. 2, можно сделать вывод о том, что содержание тяжелых металлов во всех образцах экстрактов каллусных культур медуницы лекарственной

не превышает предельно допустимого уровня. Экстракты соответствуют установленным требованиям ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты», ОФС 1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Как показывают полученные результаты, данные экстракты пригодны для использования в дальнейших исследованиях.

Радионуклиды Cs137 и Sr90 не обнаружены ни в одном из исследуемых образцов. Показатели соответствуют требованиям ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты», а также МУК 2.6.1.1194-03 «Радиационный контроль. Стронций-90 и цезий-137. Пищевые продукты. Отбор проб, анализ и гигиеническая оценка».

Результаты определения микробиологической чистоты экстрактов каллусных культур представлены в табл. 3.

Таблица 2. Содержание примесей тяжелых металлов в экстрактах каллусных культур медуницы лекарственной (*Pulmonaria officinalis*)

Table 2. Heavy metal content in *Pulmonaria officinalis* L. callus crops

| Образец | Содержание примесей тяжелых металлов, мг/кг | | | | | | | | | |
|---------|---|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|----------|
| | Pb | | Hg | | Bi | | Sb | | | |
| | Норма | Значение | Норма | Значение | Норма | Значение | Норма | Значение | Норма | Значение |
| 1 | | 0,8354±0,0009 | | 0,0092±0,0009 | Не нормируется | 0,0476±0,0001 | Не нормируется | 0,0044±0,0001 | | |
| 2 | ≤3,0000 | 0,7494±0,0009 | ≤0,1000 | 0,0114±0,0004 | | 0,0456±0,0001 | | 0,0040±0,0004 | | |
| 3 | | 0,7124±0,0002 | | 0,0128±0,0006 | | 0,0416±0,0002 | | 0,0033±0,0007 | | |
| Образец | Содержание примесей тяжелых металлов, мг/кг | | | | | | | | | |
| | Sn | | Cd | | Ag | | Cu | | | |
| | Норма | Значение | Норма | Значение | Норма | Значение | Норма | Значение | Норма | Значение |
| 1 | Не нормируется | 0,0146±0,0003 | | 0,0748±0,0008 | Не нормируется | н/о* | | ≤3,0000 | 1,2783±0,0066 | |
| 2 | | 0,0139±0,0001 | ≤1,0000 | 0,0741±0,0003 | | | | | 1,2601±0,0049 | |
| 3 | | 0,0126±0,0001 | | 0,0723±0,0007 | | | | | 1,2508±0,0021 | |
| Образец | Содержание примесей тяжелых металлов, мг/кг | | | | | | | | | |
| | Mo | | V | | Ru | | Pt | | Pd | |
| | Норма | Значение | Норма | Значение | Норма | Значение | Норма | Значение | Норма | Значение |
| 1 | | 0,0001±0,0001 | | | | | | | | |
| 2 | Не нормируется | 0,0001±0,0001 | Не нормируется | н/о | Не нормируется | н/о | Не нормируется | н/о | Не нормируется | н/о |
| 3 | | 0,0002±0,0001 | | | | | | | | |

*н/о – не обнаружено.

Таблица 3. Микробиологическая чистота экстрактов каллусных культур медуницы лекарственной

Table 3. Results of determination of microbiological purity of *Pulmonaria officinalis* L. callus crops

| Номер образца | Микробиологические показатели | | | | | | | | | |
|---------------|--------------------------------------|------------------------------------|--|------------------------------------|--|------------------------------------|----------------|------------------|---------------------------------|-------------------|
| | Общее число аэробных микроорганизмов | | Общее число дрожжевых и плесневых грибов | | Общее число энтеробактерий, устойчивых к желчи | | <i>E. coli</i> | | Бактерии рода <i>Salmonella</i> | |
| | Значение | Норма | Значение | Норма | Значение | Норма | Значение | Норма | Значение | Норма |
| 1 | | Не более 10 ⁵ КОЕ в 1 г | | Не более 10 ⁴ КОЕ в 1 г | | Не более 10 ³ КОЕ в 1 г | н/о | Отсутствие в 1 г | н/о | Отсутствие в 25 г |
| 2 | н/о | | н/о | | н/о | | | | н/о | |
| 3 | | | | | | | | | | |

*н/о – не обнаружено

Микробиологические показатели, представленные в табл. 5, соответствуют требованиям ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты».

Хроматографический анализ экстрактов показал наибольший выход биологически активных веществ в образце № 2. При анализе фитохимического состава данного экстракта каллусных культур медуницы лекарственной с применением ТСХ было идентифицировано два пятна со значением коэффициента распределения R_f 0,61; 0,69 (рис. 1). Качественные реакции с обнаруженными веществами позволили предположить, что это – тритерпеновые сапонины, производные β -амирина. Исследование I.T. Henneh, B. Huang и других показало, что β -амирин можно приме-

нять при лечении ревматоидного артрита [21]. Также соединение проявляет гепатопротекторную, противовоспалительную активность и эффективен при лечении ожирения у мышей [22].

Анализ содержащихся флавоноидов проведен после предварительного концентрирования с использованием роторного испарителя ИКА8 при вакуумировании 72 Мбар до густой консистенции. Денситограмма представлена на рис. 2. Идентифицированы рутин ($R_f=0,69$), изорамнетин ($R_f=0,81$), кверцетин ($R_f=0,925$). Было показано, что данные флавоноиды положительно влияют на продолжительность жизни модельного организма *C. elegans* [23, 24].

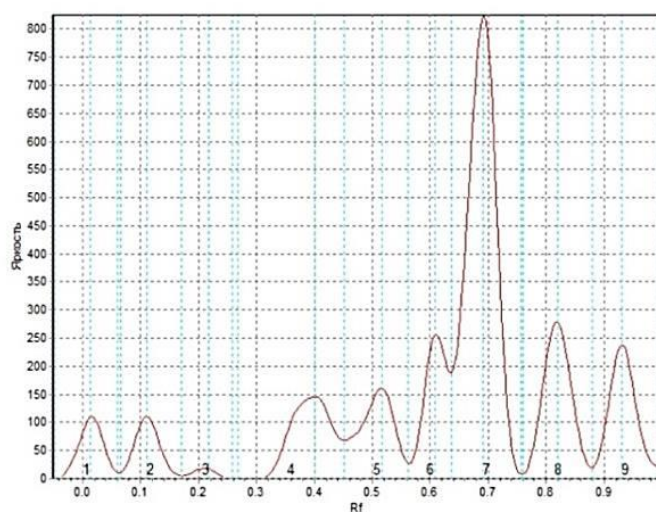


Рис. 1. Денситограмма экстракта каллусных культур медуницы лекарственной на пластине Sorbfil PTSX-AF-A (проявитель – 25%-й этанольный раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты)

Fig. 1. Densitogram of the extract from the *Pulmonaria officinalis* L. callus crops on Sorbfil PTSKh-AF-A plate (developer – 25% ethanol solution of phosphoric-tungstic acid)

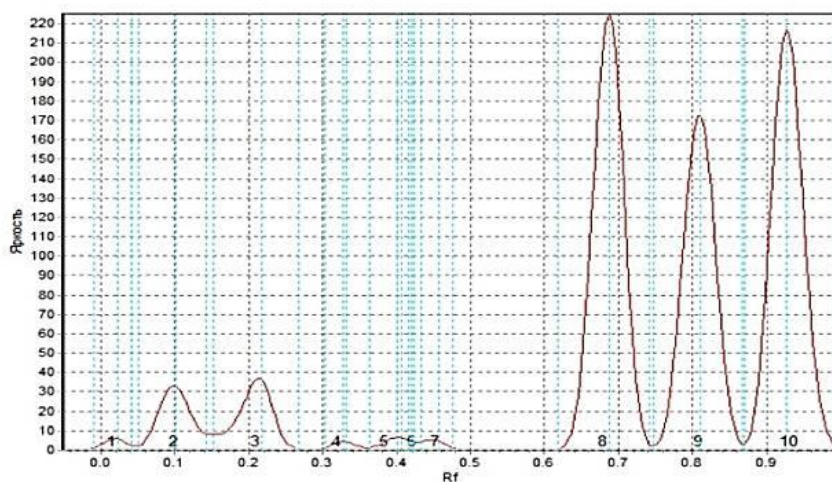


Рис. 2. Денситограмма экстракта каллусных культур медуницы лекарственной в ультрафиолете после обработки парами аммиака

Fig. 2. Densitogram of the extract from the *Pulmonaria officinalis* L. callus crops in ultraviolet light after treatment with ammonia vapor

С помощью ВЭЖХ-анализа было определено количественное содержание биологически активных веществ в экстракте каллусной культуры *Pulmonaria officinalis* (рис. 3, табл. 4).

По данным ВЭЖХ-анализа, во втором образце извлечений из культуры медуницы обнаружено содержание фенолкарбоновых кислот и тритерпенового сапонина. Также из представленных в табл. 4 данных видно, что среди идентифицированных кислот в наибольшем количестве содержится *l*-кумаровая кислота – 41,47±0,92 мг/мл. Известно, что данная кислота оказывает противораковое действие, а также проявляет мощный антиоксидантный и антидиабетический эффект [25–27]. Количество измеренной феруловой кислоты составило 15,07±0,76 мг/мл. Она задерживает патологические симптомы при болезни Альцгеймера [28] и Паркинсона [29], а также проявляет антиоксидантную и противовоспалительную активность. Галловая кислота оказывает противораковую и антиоксидантную активность, а также уменьшает тревожность и депрессию (по результатам исследования на крысах). Ее содержание в экстракте каллусной культуры медуницы лекарственной составило 8,34±0,44 мг/мл. Отметим, что ранее об идентификации в этанольных экстрактах названных фенольных кислот не сообщалось.

Содержание кофейной, розмариновой и хлорогеновой кислот в этанольном экстракте каллусной культуры *Pulmonaria officinalis* относительно высокое – от 8,23 до 13,29 мг/мл. Исследование J.Q. Li, J.S. Fang и их коллег показало, что ко-

фейная кислота продлевает жизнь и увеличивает устойчивость к стрессу у *D. melanogaster* [30]. Розмариновая кислота проявляет антиоксидантную активность, ослабляя окислительный стресс у крыс. При этом доза кислоты 12 мг/кг массы тела оказывает положительный эффект при заболевании Хантингтона. Хлорогеновая кислота снижает уровень свободных радикалов в корковых срезах крыс при окислительном стрессе, который был вызван H₂O₂ [29]. Она также увеличивает продолжительность жизни *C. elegans* через сигнальный путь инсулина/IGF-1 и выживаемость при тепловом стрессе [31]. Ранее сообщалось о наличии данных БАВ в экстракте наземных частей *Pulmonaria officinalis*, но их содержание было меньше. Так, в исследованиях E. Neagu и других содержание кофейной и хлорогеновой кислоты в этанольном экстракте медуницы составило 3,360 и 3,030 мг/мл соответственно [15]. Авторами работы [18] количество кофейной, розмариновой и хлорогеновой кислот было обнаружено в объеме 0,023; 7,002 и 0,241 мг/мл соответственно.

В настоящем исследовании впервые в экстракте каллусной культуры медуницы измерено содержание тритерпенового сапонина, которое составило 35,16±0,60 мг/мл. В работе [32] сообщается, что сапонины проявляют нейропротективный и кардиозащитный эффект за счет активации аутофагии. Также они имеют потенциал при лечении рака.

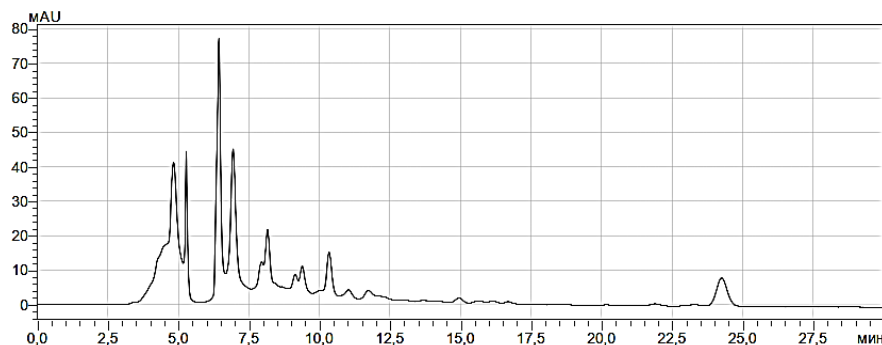


Рис. 3. Хроматограмма экстракта каллусных культур медуницы лекарственной (колонок Kromasil 5 мкм 110 Å, C – 18 250x4,6 мм)

Fig. 3. Chromatogram of the extract from the *Pulmonaria officinalis* L. callus crops (column Kromasil 5 µm 110 Å, C – 18 250x4.6 mm)

Таблица 4. Компонентный состав образцов экстракта каллусных культур медуницы лекарственной

Table 4. Components identified in *Pulmonaria officinalis* L. callus crops

| Время удерживания, мин | Наименование компонента | Количественное содержание, мг/мл |
|------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 4,79 | галловая кислота | 8,34±0,44 |
| 5,40 | тритерпеновый сапонин | 35,16±0,60 |
| 6,28 | <i>l</i> -кумаровая кислота | 41,47±0,92 |
| 7,93 | феруловая кислота | 15,07±0,76 |
| 8,15 | кофейная кислота | 13,29±0,72 |
| 10,39 | розмариновая кислота | 9,12±0,48 |
| 24,25 | хлорогеновая кислота | 8,23±0,50 |

В дальнейших исследованиях планируется изучить *in vivo* потенциальные геропротекторные свойства экстракта и индивидуальных биологически активных веществ из каллусной культуры медуницы лекарственной на модели нематоды *C. elegans*.

ВЫВОДЫ

Таким образом, результаты проведенного анализа трех образцов экстрактов каллусных культур медуницы лекарственной подтвердили их безопасность по физико-химическим и микробиологическим показателям. Содержание тяжелых металлов и радионуклидов соответствует требованиям ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты» и МУК 2.6.1.1194-03 «Радиационный контроль. Стронций-90 и цезий-137. Пищевые продукты. Отбор проб, анализ и гигиеническая оценка».

В ходе исследования был изучен фитохимический состав экстрактов, полученных из био-

массы каллусных культур медуницы лекарственной, и измерено количественное содержание биологически активных соединений с потенциальными геропротекторными свойствами. С помощью методов ВЭЖХ и ТСХ было обнаружено содержание таких веществ, как рутин, изорамнетин, кверцетин, тритерпеновый сапонин, а также фенольные кислоты. Впервые в экстракте каллусных культур медуницы лекарственной были идентифицированы и количественно измерены тритерпеновый сапонин и фенольные кислоты (*п*-кумаровая, феруловая, галловая). Содержание кофейной, розмариновой и хлорогеновой кислот в извлечениях из каллусных культур оказалось выше, чем в экстрактах из наземных частей растения. Таким образом, в дальнейшем экстракт из каллусных культур медуницы лекарственной можно исследовать на наличие у него геропротекторных свойств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prasanth M.I., Sivamaruthi B.S., Kesika P., Rosmol P.S., Tencomnao T. Unraveling the mode of action of medicinal plants in delaying age-related diseases using model organisms // *Medicinal and Aromatic Plants*. 2021. P. 37–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819590-1.00002-1>
2. Pandey S., Phulara S.C., Mishra S.K., Bajpai R., Kumar A., Niranjana A., et al. *Betula utilis* extract prolongs life expectancy, protects against amyloid- β toxicity and reduces Alpha Synuclein in *Caenorhabditis elegans* via DAF-16 and SKN-1 // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2020. Vol. 228, 108647. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108647>
3. Song B., Zheng B., Li T., Liu R.H. Raspberry extract ameliorates oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* via the SKN-1/Nrf2 pathway // *Journal of Functional Foods*. 2020. Vol. 70. Issue 17. 103977. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103977>
4. Santos M.A., Franco F.N., Caldeira C.A., de Araujo G.R., Vieira A., Chaves M.M., et al. Antioxidant effect of Resveratrol: Change in MAPK cell signaling pathway during the aging process // *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2020. Vol. 92. 104266. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2020.104266>
5. Folch J., Busquets O., Etcheto M., Sanchez-Lopez E., Pallas M., Beas-Zarate C., et al. Experimental models for aging and their potential for novel drug discovery // *Current Neuropharmacology*. 2018. Vol. 16. Issue 10. P. 1466–1483. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170707155345>
6. Lopez-Otin C., Galluzzi L., Freije J.M., Madeo F., Kroemer G. Metabolic control of longevity // *Cell*. 2016. Vol. 166. Issue 4. P. 802–821. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.031>
7. Petr M.A., Tulika T., Carmona-Marin L.M., Scheibye-Knudsen M. Protecting the Aging Genome // *Trends in Cell Biology*. 2020. Vol. 30 Issue 2. P. 117–132. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.12.001>
8. Senol F.S., Orhan I., Yilmaz G., Cicek M., Sener B. Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and tyrosinase inhibition studies and antioxidant activities of 33 *Scutellaria* L. taxa from Turkey // *Food and Chemical Toxicology*. 2010. Vol. 48 Issue 3. P. 781–788. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.004>
9. Gu J., Li Q., Liu J., Ye Z., Feng T., Wang G., et al. Ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Auricularia auricula* and effects of its acid hydrolysate on the biological function of *Caenorhabditis elegans* // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 167. P. 423–433. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.160>
10. Markaki M., Tavernarakis N. *Caenorhabditis elegans* as a model system for human diseases // *Current Opinion in Biotechnology*. 2020. Vol. 63. P. 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.011>
11. Apfeld J., Alper S. What can we learn about human disease from the nematode *C. elegans*? // *Disease Gene Identification*. 2018. Vol. 1706. P. 53–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_4
12. Полухина Т.С., Нурғалиева Г.Б. Изучение количественного содержания аскорбиновой кислоты в наземной части медуницы лекарственной (*Pulmonaria officinalis* L.) // *Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации: сб. ст. победителей V Междунар. науч.-практ. конф.: в 4 ч. (Пенза, 15 мая 2017 г.)*. Пенза: Наука и Просвещение, 2017. С. 243–245.
13. Dyshlyuk L.S., Fedorova A.M., Dolganyuk V.F., Prosekov A.Y. Optimization of extraction of polyphenolic compounds from medicinal lungwort (*Pulmonaria officinalis* L.) // *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2020. Vol. 32. Issue 24. P. 36–

45. <https://doi.org/10.9734/jpri/2020/v32i2430807>

14. Akram M., Rashid A. Anti-coagulant activity of plants: mini review // Journal of Thrombosis and Thrombolysis. 2017. Vol. 44. Issue 3. P. 406–411. <https://doi.org/10.1007/s11239-017-1546-5>

15. Neagu E., Radu G.L., Albu C., Paun G. Antioxidant activity, acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of *Pulmonaria officinalis* and *Centarium umbellatum* extracts // Saudi Journal of Biological Sciences. 2018. Vol. 25. Issue 3. P. 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.016>

16. Hawryl M.A., Waksmundzka-Hajnos M. Micro 2D-TLC of selected plant extracts in screening of their composition and antioxidative properties // Chromatographia. 2013. Vol. 76. Issue 19-20. P. 1347–1352. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2490-y>

17. Krzyzanowska-Kowalczyk J., Kolodziejczyk-Czepas J., Kowalczyk M., Pecio L., Nowak P., Stochmal A. Yunnaneic acid B, a component of *Pulmonaria officinalis* extract, prevents peroxynitrite-induced oxidative stress *in vitro* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2017. Vol. 65. Issue 19. P. 3827–3834. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00718>

18. Krzyzanowska-Kowalczyk J., Pecio L., Moldoch J., Ludwiczuk A., Kowalczyk M. Novel phenolic constituents of *Pulmonaria officinalis* L. LC-MS/MS comparison of spring and autumn metabolite profiles // Molecules. 2018. Vol. 23. Issue 9. P. 2277. <https://doi.org/10.3390/molecules23092277>

19. Захарова О.А., Любаковская Л.А., Гурина Н.С., Спиридович Е.В. Каллусная культура как альтернативный источник микроклонального размножения // Современные проблемы природопользования, охотоведения и звероводства. 2004. N 1. С. 54–55.)

20. Waidyanatha S., Pierfelice J., Cristy T., Mutlu E., Burbach B., Rider C.V., et al. A strategy for test article selection and phytochemical characterization of *Echinacea purpurea* extract for safety testing // Food and Chemical Toxicology. 2020. Vol. 137. P. 111125. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111125>

21. Henneh I.T., Huang B., Musayev F.N., Al Hashimi R., Safo M.K., Armah F.A., et al. Structural elucidation and *in vivo* anti-arthritis activity of β -amyryn and polypunonic acid isolated from the root bark of *Ziziphus abyssinica HochstEx. A Rich (Rhamnaceae)* // Bioorganic chemistry. 2020. Vol. 98. P. 103744. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103744>

22. De Melo K.M., de Oliveira F.T.B., Silva R.A.C., Quindere A.L.G., Marinho Filho J.D.B., Araujo A.J., et al. α , β -Amyryn, a pentacyclic triterpenoid from *Protium heptaphyllum* suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 cells // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019. Vol. 109. P. 1860–1866. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.027>

23. Cordeiro L.M., Machado M.L., da Silva A.F.,

Baptista F.B.O., da Silveira T.L., Soares F.A.A., et al. Rutin protects Huntington's disease through the insulin/IGF1 (IIS) signaling pathway and autophagy activity: study in *Caenorhabditis elegans* model // Food and Chemical Toxicology. 2020. Vol. 141. P. 111323. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111323>

24. Sugawara T., Sakamoto K. Quercetin enhances motility in aged and heat-stressed *Caenorhabditis elegans* nematodes by modulating both HSF-1 activity, and insulin-like and p38-MAPK signalling // PloS ONE. 2020. Vol. 15. Issue 9. e0238528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238528>

25. Sharma S.H., Rajamanickam V., Nagarajan S. Supplementation of p-coumaric acid exhibits chemopreventive effect via induction of Nrf2 in a short-term preclinical model of colon cancer // European Journal of Cancer Prevention. 2019. Vol. 28. Issue 6. P. 472–482. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000496>

26. Amalan V., Vijayakumar N., Indumathi D., Ramakrishnan A. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of p-coumaric acid in diabetic rats, role of pancreatic GLUT 2: *in vivo* approach // Biomedicine and Pharmacotherapy. 2016. Vol. 84. P. 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.039>

27. Peng J., Zheng T.-T., Liang Y., Duan L.-F., Zhang Y.-D., Wang L.J., et al. p-Coumaric acid protects human lens epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis by MAPK signaling // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018. Vol. 2018. P. 8549052. <https://doi.org/10.1155/2018/8549052>

28. Wang N., Zhou Y., Zhao L., Wang C., Ma W., Ge G., et al. Ferulic acid delayed amyloid β -induced pathological symptoms by autophagy pathway via a fasting-like effect in *Caenorhabditis elegans* // Food and Chemical Toxicology. 2020. Vol. 146. P. 111808. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111808>

29. Szwajgier D., Borowiec K., Pustelniak K. The neuroprotective effects of phenolic acids: molecular mechanism of action // Nutrients. 2017. Vol. 9. Issue 5. P. 477. <https://doi.org/10.3390/nu9050477>

30. Li J.-Q., Fang J.-S., Qin X.-M., Gao L. Metabolomics profiling reveals the mechanism of caffeic acid in extending lifespan in *Drosophila melanogaster* // Food & Function. 2020. Vol. 11. Issue 9. P. 8202–8213. <https://doi.org/10.1039/d0fo01332c>

31. Carranza A.D.V., Saragusti A., Chiabrand G.A., Carrari F., Asis R. Effects of chlorogenic acid on thermal stress tolerance in *C. elegans* via HIF-1, HSF-1 and autophagy // Phytomedicine. 2019. Vol. 66. P. 153132. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153132>

32. Han B., He C. Targeting autophagy using saponins as a therapeutic and preventive strategy against human diseases // Pharmacological Research. 2021. Vol. 166. P. 105428. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105428>

REFERENCES

1. Prasanth MI, Sivamaruthi BS, Kesika P, Rosmol PS, Tencomnao T. Unraveling the mode of action of medicinal plants in delaying age-related diseases using model organisms. *Medicinal and Aromatic Plants*. 2021;37–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819590-1.00002-1>
2. Pandey S, Phulara SC, Mishra SK, Bajpai R, Kumar A, Niranjana A, et al. Betula utilis extract prolongs life expectancy, protects against amyloid- β toxicity and reduces Alpha Synuclein in *Caenorhabditis elegans* via DAF-16 and SKN-1. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2020;228:108647. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108647>
3. Song B, Zheng B, Li T, Liu RH. Raspberry extract ameliorates oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* via the SKN-1/Nrf2 pathway. *Journal of Functional Foods*. 2020;70(17):103977. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103977>
4. Santos MA, Franco FN, Caldeira CA, de Araujo GR, Vieira A, Chaves MM, et al. Antioxidant effect of Resveratrol: Change in MAPK cell signaling pathway during the aging process. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2020;92:104266. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2020.104266>
5. Folch J, Busquets O, Etcheto M, Sanchez-Lopez E, Pallas M, Beas-Zarate C, et al. Experimental models for aging and their potential for novel drug discovery. *Current Neuropharmacology*. 2018;16(10):1466–1483. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170707155345>
6. Lopez-Otin C, Galluzzi L, Freije JM, Madeo F, Kroemer G. Metabolic control of longevity. *Cell*. 2016;166(4):802–821. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.031>
7. Petr MA, Tulika T, Carmona-Marin LM, Scheibye-Knudsen M. Protecting the Aging Genome. *Trends in Cell Biology*. 2020;30(2):117–132. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.12.001>
8. Senol FS, Orhan I, Yilmaz G, Cicek M, Sener B. Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and tyrosinase inhibition studies and antioxidant activities of 33 *Scutellaria* L. taxa from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(3):781–788. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.004>
9. Gu J, Li Q, Liu J, Ye Z, Feng T, Wang G, et al. Ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Auricularia auricula* and effects of its acid hydrolysate on the biological function of *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;167:423–433. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.160>
10. Markaki M, Tavernarakis N. *Caenorhabditis elegans* as a model system for human diseases. *Current Opinion in Biotechnology*. 2020;63:118–125. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.011>
11. Apfeld J, Alper S. What can we learn about human disease from the nematode *C. elegans*? *Disease Gene Identification*. 2018;1706:53–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_4
12. Polukhina TS, Nurgalieva GB. Study of quantitative content of ascorbic acid in the supervisory part of the *Pulmonaria officinalis*. In: *Fundamental'nye i prikladnye nauchnye issledovaniya: aktual'nye voprosy, dostizheniya i innovatsii: sbornik statei pobeditelei V Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii = Fundamental and Applied Scientific Research: Topical Issues, Achievements and Innovations: Collection of Articles by the Winners of the V International Scientific and Practical Conference*. Penza, 15 May 2017. Penza: Nauka i Prosveshchenie; 2017, p 243–245. (In Russian)
13. Dyshlyuk LS, Fedorova AM, Dolganyuk VF, Prosekov AY. Optimization of extraction of polyphenolic compounds from medicinal lungwort (*Pulmonaria officinalis* L.). *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2020;32(24):36–45. <https://doi.org/10.9734/jpri/2020/v32i2430807>
14. Akram M, Rashid A. Anti-coagulant activity of plants: mini review. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2017;44(3):406–411. <https://doi.org/10.1007/s11239-017-1546-5>
15. Neagu E, Radu GL, Albu C, Paun G. Antioxidant activity, acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of *Pulmonaria officinalis* and *Centarium umbellatum* extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2018;25(3):578–585. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.016>
16. Hawryl MA, Waksmundzka-Hajnos M. Micro 2D-TLC of selected plant extracts in screening of their composition and antioxidative properties. *Chromatographia*. 2013;76(19-20):1347–1352. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2490-y>
17. Krzyzanowska-Kowalczyk J, Kolodziejczyk-Czepas J, Kowalczyk M, Pecio L, Nowak P, Stochmal A. Yunnaneic acid B, a component of *Pulmonaria officinalis* extract, prevents peroxynitrite-induced oxidative stress *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65(19):3827–3834. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00718>
18. Krzyzanowska-Kowalczyk J, Pecio L, Moldoch J, Ludwiczuk A, Kowalczyk M. Novel phenolic constituents of *Pulmonaria officinalis* L. LC-MS/MS comparison of spring and autumn metabolite profiles. *Molecules*. 2018;23(9):2277. <https://doi.org/10.3390/molecules23092277>
19. Zakharova OA, Lyubakovskaya LA, Gurina NS, Spiridovich EV. Callus as alternative source of microclonal multiplication. *Sovremennyye problemy prirodopol'zovaniya, okhotovedeniya i zverovodstva = Modern problems of nature management, hunting and animal husbandry*. 2004;1:54–55. (In Russian)
20. Waidyanatha S, Pierfelice J, Cristy T, Mutlu E, Burbach B, Rider CV, et al. A strategy for test article selection and phytochemical characterization of *Echinacea purpurea* extract for safety testing. *Food and Chemical Toxicology*. 2020;137:111125. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111125>

21. Henneh IT, Huang B, Musayev FN, Al Hashimi R, Safo MK, Armah FA, et al. Structural elucidation and in vivo anti-arthritis activity of β -amyirin and polpunonic acid isolated from the root bark of *Ziziphus abyssinica* Hochst. *Ex. A Rich (Rhamnaceae)*. *Bioorganic chemistry*. 2020;98:103744. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103744>

22. De Melo KM, de Oliveira FTB, Silva RAC, Quindere ALG, Marinho Filho JDB, Araujo AJ, et al. α, β -Amyrin, a pentacyclic triterpenoid from *Protium heptaphyllum* suppresses adipocyte differentiation accompanied by down regulation of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;109:1860–1866. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.027>

23. Cordeiro LM, Machado ML, da Silva AF, Baptista FBO, da Silveira TL, Soares FAA, et al. Rutin protects Huntington's disease through the insulin/IGF1 (IIS) signaling pathway and autophagy activity: study in *Caenorhabditis elegans* model. *Food and Chemical Toxicology*. 2020;141:111323. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111323>

24. Sugawara T, Sakamoto K. Quercetin enhances motility in aged and heat-stressed *Caenorhabditis elegans* nematodes by modulating both HSF-1 activity, and insulin-like and p38-MAPK signaling. *PLoS ONE*. 2020;15(9):e0238528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238528>

25. Sharma SH, Rajamanickam V, Nagarajan S. Supplementation of p-coumaric acid exhibits chemopreventive effect via induction of Nrf2 in a short-term preclinical model of colon cancer. *European Journal of Cancer Prevention*. 2019;28(6):472–482. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000496>

26. Amalan V, Vijayakumar N, Indumathi D, Ramakrishnan A. Antidiabetic and antihyperlipidem-

ic activity of p-coumaric acid in diabetic rats, role of pancreatic GLUT 2: in vivo approach. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2016;84:230–236. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.039>

27. Peng J, Zheng T-T, Liang Y, Duan L-F, Zhang Y-D, Wang L-J, et al. p-Coumaric acid protects human lens epithelial cells against oxidative stress-induced apoptosis by MAPK signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018:8549052. <https://doi.org/10.1155/2018/8549052>

28. Wang N, Zhou Y, Zhao L, Wang C, Ma W, Ge G, et al. Ferulic acid delayed amyloid β -induced pathological symptoms by autophagy pathway via a fasting-like effect in *Caenorhabditis elegans*. *Food and Chemical Toxicology*. 2020;146:11808. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111808>

29. Szwajgier D, Borowiec K, Pustelniak K. The neuroprotective effects of phenolic acids: molecular mechanism of action. *Nutrients*. 2017;9(5):477. <https://doi.org/10.3390/nu9050477>

30. Li J-Q, Fang J-S, Qin X-M, Gao L. Metabolomics profiling reveals the mechanism of caffeic acid in extending lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Food & Function*. 2020;11(9):8202–8213. <https://doi.org/10.1039/d0fo01332c>

31. Carranza ADV, Saragusti A, Chiabrando GA, Carrari F, Asis R. Effects of chlorogenic acid on thermal stress tolerance in *C. elegans* via HIF-1, HSF-1 and autophagy. *Phytomedicine*. 2019;66:153132. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153132>

32. Han B, He C. Targeting autophagy using saponins as a therapeutic and preventive strategy against human diseases. *Pharmacological Research*. 2021;166:105428. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105428>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Дышлюк Любовь Сергеевна,

к.б.н., доцент кафедры бионанотехнологии,
Кемеровский государственный университет,
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,
Российская Федерация,
e-mail: soldatovals1984@mail.ru

Дроздова Маргарита Юрьевна,

магистрант, лаборант-исследователь
лаборатории биотестирования природных
нутрицевтиков,
Кемеровский государственный университет,
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,
Российская Федерация,
✉ e-mail: drozdowa.margarita.00@yandex.ru

Лосева Анна Ивановна,

к.т.н., начальник Центра научной периодики,
Кемеровский государственный университет,
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Lubov S. Dushlyuk,

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Department of Bionanotechnology,
Kemerovo State University,
6, Krasnaya St., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
e-mail: soldatovals1984@mail.ru

Margarita Yu. Drozdova,

Master Student, Researcher,
Natural Nutraceutical Bioassay Laboratory,
Kemerovo State University,
6, Krasnaya St., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
✉ e-mail: drozdowa.margarita.00@yandex.ru

Anna I. Loseva,

Cand. Sci. (Engineering),
Head of the Department of Scientific
and Publishing Activities,

Российская Федерация,
e-mail: unid.kemsu@mail.ru

Kemerovo State University,
6, Krasnaya St., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
e-mail: unid.kemsu@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

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

*Поступила в редакцию 03.02.2021.
Одобрена после рецензирования 18.04.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.*

*The article was submitted 03.02.2021.
Approved after reviewing 18.04.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК [633.11+6333.112.9]: 581.142:631.53.02:631.547.1:631.811.98: 631.53.026

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-272-280>



Влияние протатранов на всхожесть семян пшеницы и тритикале после их длительного хранения

© Г.И. Филипенко*, С.Н. Адамович**, Е.Н. Оборина**,
И.Б. Розенцвейг***, Г.Ф. Сафина*

*Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР),
г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

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

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

Резюме: Цель работы – исследование химических соединений ряда протатранов в качестве биостимуляторов всхожести пшеницы и тритикале после длительного хранения их семян, что обусловлено необходимостью восстановления всхожести уникальных образцов зерновых культур из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (Санкт-Петербург). В качестве объекта исследований использовали семена разных лет репродукции, имеющие разную исходную всхожесть, а также семена с исходно высокой всхожестью и подвергнутые ускоренному старению. Опыты велись в присутствии физиологически активных нетоксичных соединений – протатранов 2-Ме-С₆H₄OCH₂COO⁻ · HN⁺(CH₂CH₂OH)₃ (1) и 4-Cl-C₆H₄SCH₂COO⁻ · HN⁺(CH₂CH₂OH)₃ (2), в широком диапазоне концентраций (1 · 10⁻²–1 · 10⁻⁹ М). На первом этапе исследовано действие протатрана 1 на всхожесть мягкой яровой пшеницы. Наблюдали, что под влиянием соединения 1 в концентрациях от 10⁻⁴ до 10⁻⁹ М всхожесть семян повышалась на 8,7–20,0%, а энергии прорастания – на 4,7–8,0%. Использование протатрана 1 в более высокой концентрации (10⁻² М) приводило к снижению всхожести. Далее были проведены опыты на трех образцах семян мягкой озимой пшеницы, хранившихся в течение 52 лет и имевших всхожесть 19–26%. Экспозиция семян в течение 20 ч в водных растворах соединения 1 концентрации 5 · 10⁻⁷–10⁻⁹ М приводила к повышению всхожести на 3,7–10,0%. Наилучший стимулирующий эффект давала концентрация 5 · 10⁻⁷ М. На следующем этапе работы использовали семена, имеющие высокую исходную всхожесть (86–96%), но подвергнутые процедуре ускоренного старения. Обработка таких образцов протатраном 1 в концентрации 10⁻⁶ и 10⁻⁴ М менее эффективна: энергия прорастания и всхожесть не изменялись или увеличивались незначительно (на 3,5 и 7,5% соответственно). Аналогично осуществляли обработку семян тритикале протатранами 1 и 2 в концентрации 5 · 10⁻⁷ М. Показано, что действие соединений 1 и 2 приводит к увеличению всхожести на 3–7% и выраженному повышению энергии прорастания на 7–45%. При дальнейшей оптимизации процесса и выборе наиболее активных протатранов описанный здесь подход может обеспечить значимое восстановление всхожести семян.

Ключевые слова: семена, пшеница, тритикале, биостимуляторы, протатраны, хранение, всхожесть

Благодарности: Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту N 0662-2019-0006 «Поиск, поддержание жизнеспособности и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

Синтез протатранов проведен на оборудовании Байкальского аналитического центра коллективного пользования СО РАН.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Иркутской области в рамках научного проекта 20-43-380001.

Для цитирования: Филипенко Г.И., Адамович С.Н., Оборина Е.Н., Розенцвейг И.Б., Сафина Г.Ф. Влияние протатранов на всхожесть семян пшеницы и тритикале после их длительного хранения. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 2. С. 272–280. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-272-280>

Effects of protatranes on the germination of wheat and triticale seeds after their long-term storage

Galina I. Filipenko*, Sergei N. Adamovich**, Elizavete N. Oborina**,
Igor B. Rozentsveig***, Guzel F. Safina*

*Federal Research Center
N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources,
St. Petersburg, Russian Federation

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

***Irkutsk State University,
Irkutsk, Russian Federation

Abstract: The article studies the chemical compounds of a number of protatranes as biostimulants of the germination of wheat and triticale seeds after their long-term storage. The relevance of the study is determined by the need to restore the germination of unique samples of grain crops from the collection of the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR) (Saint Petersburg). The research objects were the seeds of different years of reproduction with various levels of original germination, as well as those with an initially high germination and subjected to accelerated aging. The experiments were conducted in the presence of the following physiologically active non-toxic protatranes $2\text{-Me-C}_6\text{H}_4\text{OCH}_2\text{COO}^- \cdot \text{HN}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$ (**1**) and $4\text{-Cl-C}_6\text{H}_4\text{SCH}_2\text{COO}^- \cdot \text{HN}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$ (**2**) across a wide range of concentrations ($1 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-9}$ M). At the first stage, the effect of protatrane **1** on the germination of soft spring wheat was investigated. It was observed that, under the influence of protatrane **1** at concentrations from 10^{-4} to 10^{-9} M, the seed germination and the germination energy increased by 8.7–20.0% and 4.7–8.0%, respectively. The use of protatrane **1** at higher concentrations (10^{-2} M) resulted in a decrease in germination. Subsequently, experiments were carried out on 3 samples of soft winter wheat seeds stored for 52 years and having the germination of 19–26%. The 20-hour exposure of seeds to water solutions of protatrane **1** at concentrations of $5 \cdot 10^{-7}$ – 10^{-9} M increased their germination by 3.7–10.0%. The best stimulating effect was achieved at a concentration of $5 \cdot 10^{-7}$ M. At the next stage, the seeds with a high original germination (86–96%) and subjected to accelerated aging were investigated. The treatment of such samples with protatrane **1** at concentrations of 10^{-6} and 10^{-4} M turned out to be less effective: the germination and its energy either remained the same or increased insignificantly (by 3.5% and 7.5%, respectively). The treatment of triticale seeds with protatranes **1** and **2** at a concentration of $5 \cdot 10^{-7}$ M was carried out in a similar manner. It was shown that the action of protatranes **1** and **2** led to an increase in the germination by 3–7% and a significant increase in the germination energy by 7–45%. By further optimising the production process and selecting the most active protatranes, the described approach can provide for a significant recovery of seed germination.

Keywords: seeds, wheat, triticale, biostimulants, protatranes, storage, germination

Acknowledgments: The work was carried out within the framework of the state assignment in accordance with the VIR's thematic plan for project no. 0662-2019-0006 "Search, viability maintenance and the discovery of the potential of hereditary variability of the VIR world collection of grains and cereals for the development of the optimised gene bank and rational use in breeding and crop production."

The synthesis of protatranes was carried out using the facilities of the Baikal Analytical Centre for Collective Use of the SB RAS.

The study was carried out with the financial support of the Russian Fund for Basic Research (RFBR) and the Government of the Irkutsk Region as a part of the scientific project no. 20-43-380001.

For citation: Filipenko GI, Adamovich SN, Oborina EN, Rozentsveig IB, Safina GF. Effects of protatranes on the germination of wheat and triticale seeds after their long-term storage. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):272–280. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-272-280>

ВВЕДЕНИЕ

По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО), в мире существует более 1700 генных банков, сохраня-

ющих около 7,5 млн коллекционных образцов растений¹. Коллекция Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР; Санкт-Петербург, Россия) насчиты-

¹FAO. The Second Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome: Commission on genetic resources for food and agriculture FAO, 2010. Available from: http://www.fao.org/docrep/013/i1500e/i1500e_brief.pdf [Accessed 30 October 2020].

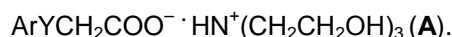
ваит более 300 тыс. образцов, из них более 54 тыс. составляет коллекция отдела генетических ресурсов пшеницы.

Длительное сохранение и поддержание коллекции осуществляется с использованием низкотемпературных технологий, путем пересевов и др.

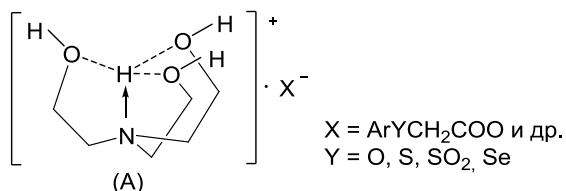
Тем не менее длительное хранение семян растений неизбежно приводит к их старению, снижению жизнеспособности и всхожести. Для повышения всхожести и ускорения прорастания семян в сельском хозяйстве используются различные регуляторы роста растений (PPP).

Ранее нами была исследована возможность восстановления всхожести семян пшеницы с помощью таких PPP, как ауксины и янтарная кислота. Было показано, что для старых семян эти PPP малоэффективны [1].

На основе доступных реагентов – биологически активных арилхалькогенилуксусных кислот и биогенных этаноламинов (в частности, триэтанолamina), в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского синтезирован ряд атранов, а именно, протатранов, общей формулы



Установлены их физические и химические свойства, а также трициклическая структура [2–9]



Благодаря своему уникальному составу и строению протатраны (A) обладают синергическим эффектом и проявляют биологическую активность, многократно превосходящую активность исходных кислот и аминов.

Среди протатранов выявлены нетоксичные (LD₅₀ 2000–6000 мг · кг⁻¹) вещества с высокой биодоступностью и физиологической (иммунотропной, противовоспалительной, противоопухолевой, антиметастатической, антитромботической, антисклеротической и др.) активностью – перспективные соединения для дизайна передовых лекарственных препаратов [2, 3, 7, 10].

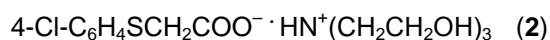
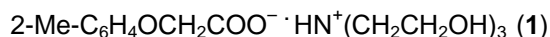
С другой стороны, ряд протатранов в чрезвычайно низких концентрациях (до 1 · 10⁻¹² мол. %) оказались мощными активаторами различных биологических процессов, например, таких, как получение пивоваренного солода, хлебопекар-

ных дрожжей, кормового и пищевого белка, лимонной кислоты, биоэтанола, а также увеличение биомассы женьшеня, полезных бактерий нефтедеструкторов и др. Это открывает путь к широкому использованию протатранов в биотехнологии, клинической микробиологии и экологии [2, 5, 6, 8–10]. Кроме того, протатраны оказывают защитное, ростстимулирующее и др. действие на животных, птиц, рыб, насекомых и растения [2, 5, 6, 8–10], что может привести к повышению эффективности ветеринарии [10], продуктивности аквакультур [11] и сельского хозяйства [5, 12–18]. В ряде работ было показано, что предпосевная обработка семян сельскохозяйственных культур некоторыми протатранами увеличивает их урожайность [5, 12, 13].

Целью настоящей работы являлось исследование влияния протатранов на всхожесть пшеницы и тритикале после длительного хранения их семян.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В данном исследовании на основе усовершенствованного нами способа [19] были синтезированы протатраны:



Синтез протатранов 1, 2 (общая методика). Смесь 0,01 моль арилхалькогенилуксусной кислоты и 0,01 моль NaOH или KOH перемешивали при кипении в 30 мл метанола или этанола в течение 1 ч. Затем добавляли 0,01 моль гидрохлорида триэтанолamina. Смесь перемешивали еще 2 ч, затем охлаждали до 5 °С. Осадок NaCl (или KCl) отфильтровывали, растворитель отгоняли, получали твердый продукт с выходом до 99,8%. Чистота соединений 1, 2 составляла 99,7–99,8%.

В экспериментах использовали протатран 1 в концентрации 1 · 10⁻²–1 · 10⁻⁹ М и протатран 2 в концентрации 5 · 10⁻⁷ М. При выборе концентрации ориентировались на литературные данные [5, 12, 13]. Всхожесть семян пшеницы и тритикале определяли по ГОСТ-12038-84. Ускоренное старение семян проводили по разработанной нами методике [15]. Семена для опытов использовали в 3-х повторностях.

Для работы применяли семена пшеницы и тритикале из коллекции ВИР разных лет репродукции и имеющих разную исходную всхожесть (табл. 1), а также семена пшеницы с исходно высокой всхожестью и подвергнутые ускоренному старению (табл. 2).

Таблица 1. Образцы коллекции ВИР, использованные в опытах по изучению всхожести семян после хранения

Table 1. Samples of the VIR collection used in the study of seed germination after storage

| Номер по каталогу ВИР | Образец сорта | Место репродукции | Год репродукции | Энергия прорастания, % | Всхожесть, % |
|-----------------------|-------------------------------------|---------------------|-----------------|------------------------|--------------|
| Пшеница мягкая яровая | | | | | |
| 16742 | – | Республика Дагестан | 2012 | 13,3±3,7 | 17,3±5,1 |
| 66378 | Омская юбилейная | Омская обл. | 2016 | 91,0±3,0 | 96,0±2,0 |
| 66387 | Ом ГАУ 100 (Эритроспермум 88-12) | Омская обл. | 2016 | 69±7,0 | 86,0±4,0 |
| 66388 | Столыпинская 2 | Омская обл. | 2017 | 67,0±9,0 | 91,0±1,0 |
| Пшеница мягкая озимая | | | | | |
| – | Турунд | г. Пушкин | 1968 | 2,5±1,9 | 19,0±2,0 |
| – | Зорька | г. Пушкин | 1968 | 2,0±1,0 | 26,0±2,0 |
| – | Старке | г. Пушкин | 1968 | 6,0±3,6 | 22,2±0,7 |
| Тритикале | | | | | |
| 2669 | ПРАГ 336 | Республика Дагестан | 2015 | 72,0±5,0 | 91,0±1,0 |
| 2806 | Л 372 | Республика Дагестан | 2015 | 25,0±1,0 | 94,0±2,0 |
| 2817 | Пушкинский 22/1 | Республика Дагестан | 2015 | 42,0±2,0 | 67,0±1,0 |

Таблица 2. Посевные качества образцов мягкой яровой пшеницы после ускоренного старения

Table 2 Sowing qualities of soft spring wheat samples after accelerated aging

| Номер по каталогу ВИР | Продолжительность ускоренного старения | | |
|------------------------|--|----------|----------|
| | 0 | 1 неделя | 4 недели |
| Энергия прорастания, % | | | |
| 66378 | 91,0±3,0 | 98,5±0,5 | 0 |
| 66387 | 69,0±7,0 | 30,5±3,5 | 0 |
| 66388 | 67,0±9,0 | 19,0±1,5 | 0 |
| Всхожесть, % | | | |
| 66378 | 96,0±2,0 | 98,5±0,5 | 0 |
| 66387 | 86,0±4,0 | 39,5±4,5 | 0 |
| 66388 | 91,0±1,0 | 25,0±4,0 | 0 |

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В широком диапазоне концентраций (10^{-2} – 10^{-9} М) было исследовано действие протатрана 1 на всхожесть мягкой яровой пшеницы (к-16742). Установлено, что под влиянием соединения 1 в концентрациях от 10^{-4} до 10^{-9} М наблюдалось повышение всхожести на 8,7–20%, а энергии прорастания – на 4,7–8,0%. В более высокой концентрации (10^{-2} М) протатран 1 приводил к снижению всхожести (табл. 3).

Далее были проведены опыты на 3-х образцах семян мягкой озимой пшеницы, хранившихся

в течение 52 лет – первые 32 года при температуре 7–9 °С, позже – при температуре -10 °С. Данные образцы имели всхожесть после хранения 19–26%. Растворы протатрана 1 использовали в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ – 10^{-9} М.

Экспозиция семян в течение 20 ч в растворах соединения 1 приводила к повышению всхожести на 3,7–10,0%. При этом наиболее заметный стимулирующий эффект давала концентрация $5 \cdot 10^{-7}$ М. Увеличение всхожести с протатраном 1 в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М сопровождалось увеличением энергии прорастания (табл. 4).

Таблица 3. Влияние протатрана 1 в концентрации 10^{-2} – 10^{-9} М на всхожесть семян мягкой яровой пшеницы (номер по каталогу ВИР 16742)

Table 3. Effect of protatran 1 at a concentration of 10^{-2} – 10^{-9} М on the germination of soft spring wheat seeds, catalog number VIR 16742

| Показатель, % | Контроль (H ₂ O) | Протатран 1 (концентрация, М) | | | | | |
|---------------------|-----------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 10^{-9} | 10^{-7} | 10^{-5} | 10^{-4} | 10^{-3} | 10^{-2} |
| Энергия прорастания | 13,3±3,7 | 20,7±4,2 | 18,0±4,2 | 21,3±6,4 | 19,3±4,1 | 12,7±4,0 | 4,8±1,8 |
| Всхожесть | 17,3±5,1 | 26,0±5,3 | 33,3±4,7 | 37,3±2,4 | 37,0±6,2 | 24,7±5,1 | 9,0±1,0 |

Таблица 4. Влияние протатрана 1 на энергию прорастания и всхожесть мягкой озимой пшеницы после длительного хранения

Table 4. Effect of protatran 1 on germination energy and germination of soft winter wheat after long-term storage

| Образец сорта | Контроль (H ₂ O) | Протатран 1 (концентрация, М) | | |
|------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| | | 10 ⁻⁹ | 5·10 ⁻⁹ | 5·10 ⁻⁷ |
| Энергия прорастания, % | | | | |
| Турунд | 2,5±1,9 | 2,7±0,7 | 2,8±1,6 | 6,0±3,2 |
| Зорька | 2,0±1,0 | 18,0±2,0 | 4,5±0,5 | 12,0±2,0 |
| Старке | 6,0±3,6 | 5,3±3,3 | 2,4±0,5 | 8,1±2,3 |
| Всхожесть, % | | | | |
| Турунд | 19,0±1,2 | 25,0±2,0 | 22,7±2,9 | 27,0±2,9 |
| Зорька | 26,0±2,0 | 26,5±1,7 | 30,0±2,9 | 36±1,6 |
| Старке | 22,2±1,7 | 30,0±6,0 | 27,0±3,0 | 31,2±3,3 |

На следующем этапе работы были использованы семена трех образцов пшеницы – к-66378, к-66387 и к-66388, имеющих высокую исходную всхожесть (86–96%) и подвергнутые процедуре ускоренного старения в течение одной и четырех недель (см. табл. 2).

Показано, что при ускоренном старении в течение одной недели у образца к-66378 со всхожестью 96% наблюдалось небольшое повышение всхожести – до 98,5%. У образцов к-66387 и к-66388 после одной недели старения всхожесть снижалась с 86,0 до 39,5% и с 91,0 до 25,0% соответственно.

Обработка образцов к-66378 и к-66388 после недели ускоренного старения протатраном 1 в концентрации 10⁻⁶ М и 10⁻⁴ М не давала заметного эффекта. Однако у образца к-66387 при обработке соединением 1 (10⁻⁴ М) энергия прорастания и всхожесть были выше, чем в контроле, на

3,5 и 7,5% соответственно.

После 4-х недель старения семена всех трех образцов полностью потеряли всхожесть. Обработка образцов к-66387 и к-66388 протатраном 1 в концентрациях 10⁻⁶ М и 10⁻⁴ М не привела к восстановлению их всхожести. Однако у образца к-66378 с самой высокой исходной всхожестью (96%) энергия прорастания и всхожесть восстанавливались на 2% (табл. 5).

Также проведены опыты с семенами 3-х сортов тритикале – к-2669, к-2806, к-2817, имеющих всхожесть от 67 до 94%. Их обработку осуществляли протатранами 1 и 2 при найденной нами наиболее эффективной концентрации 5·10⁻⁷ М. Показано, что действие соединений 1 и 2 приводит к росту всхожести на 3–7% и выраженному повышению энергии прорастания на 7–45% у всех трех образцов (табл. 6).

Таблица 5. Влияние протатрана 1 на посевные качества семян мягкой яровой пшеницы после ускоренного старения

Table 5. Effect of protatran 1 on sowing qualities of soft spring wheat seeds after accelerated aging

| Номер по каталогу ВИР | Продолжительность ускоренного старения, нед. | Контроль (H ₂ O) | Протатран 1 (концентрация, М) | |
|------------------------|--|-----------------------------|-------------------------------|------------------|
| | | | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁴ |
| Энергия прорастания, % | | | | |
| 66378 | 1 | 98,5±0,5 | 97,0±1,3 | 96,5±0,5 |
| | 4 | 0 | 2,0±0 | 2,0±0 |
| 66387 | 1 | 30,5±3,5 | 25,0±5,0 | 34,0±3,0 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 66388 | 1 | 19,0±1,5 | 15,5±3,5 | 17,5±1,5 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Всхожесть, % | | | | |
| 66378 | 1 | 98,5±0,5 | 98,0±1,0 | 96,5±0,5 |
| | 4 | 0 | 2,0±0 | 2,0±0 |
| 66387 | 1 | 39,5±4,5 | 37,5±0,5 | 47,0±2,0 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 66388 | 1 | 25,0±4,0 | 25,0±2,0 | 26,0±2,0 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 |

Таблица 6. Влияние протатранов 1 и 2 на энергию прорастания и всхожесть семян тритикале

Table 6. Effect of protatranes 1 and 2 on the germination energy and germination of triticale seeds

| Номер по каталогу ВИР | Контроль (H ₂ O) | Протатран 1 (концентрация 5·10 ⁻⁷ М) | Протатран 2 (концентрация 5·10 ⁻⁷ М) |
|------------------------|-----------------------------|---|---|
| Энергия прорастания, % | | | |
| 2669 | 72,0±5,0 | 84,0±6,0 | 79,0±5,0 |
| 2806 | 25,0±1,0 | 70,0±2,0 | 63,0±3,0 |
| 2817 | 42,0±2,0 | 49,0±3,0 | 51,0±1,0 |
| Всхожесть, % | | | |
| 2669 | 91,0±1,0 | 95,0±1,0 | 98,0±0 |
| 2806 | 94,0±2,0 | 98,0±0 | 97,0±1,0 |
| 2817 | 67,0±1,0 | 71,0±5,0 | 71,0±7,0 |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основе доступных реактивов усовершенствованным методом синтезированы нетоксичные и экологически безопасные химические соединения – протатраны 1 и 2 – потенциальные биостимуляторы всхожести пшеницы и тритикале после длительного хранения их семян.

Опыты по влиянию соединений 1 и 2 на всхожесть семян пшеницы и тритикале показали, что эффект неоднозначен и зависит от нескольких факторов, в частности, от концентрации стимулятора, а также физиологического статуса семян, а именно, от их исходной всхожести. Установлено, что у семян пшеницы и тритикале с исходной всхожестью, близкой к 20% и выше,

всхожесть удается восстановить на 3–20%. Стимулирующий эффект давали микроконцентрации протатранов 1 и 2 от 10⁻⁴ до 10⁻⁹ М. Наиболее эффективной в большинстве случаев была концентрация стимуляторов 5·10⁻⁷ М. Повышение всхожести сопровождается увеличением энергии прорастания проростков на 3–45%. Восстановить всхожесть семян пшеницы с критически низкой исходной всхожестью на данном этапе исследования не удалось. Тем не менее при дальнейшей оптимизации процесса и применении стратегии, основанной на скрининге и выборе наиболее эффективных протатранов, описанный здесь подход может обеспечить значимое восстановление всхожести семян.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сафина Г.Ф., Филипенко Г.И. Влияние гетероауксина и янтарной кислоты на всхожесть семян пшеницы после их длительного хранения // Международный научно-исследовательский журнал. 2018. N 11-1 (77). С. 143–147. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2018.77.11.027>
2. Mirskova A.N., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Voronkov M.G. Pharmacologically active salts and ionic liquids based on 2-hydroxyethylamines, arylchalcogenylacetic acids, and essential metals // Russian Chemical Bulletin. 2014. Vol. 63. Issue 9. P. 1869–1883. <https://doi.org/10.1007/s11172-014-0679-3>
3. Mirskova A.N., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Kolesnikova O.P., Schilde U. Immunoactive ionic liquids based on 2-hydroxyethylamines and 1-R-indol-3-ylsulfanylacetic acids. Crystal and molecular structure of immunodepressant tris-(2-hydroxyethyl)ammonium indol-3-ylsulfanylacetate // Open Chemistry. 2015. Vol. 13. Issue 1. P. 149–155. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0018>
4. Ushakov I.A., Voronov V.K., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Mirskova A.N. The NMR study of biologically active metallated alkanol ammonium ionic liquids // Journal of Molecular Structure 2016. Vol. 1103. P. 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.08.074>
5. Мирскова А.Н., Адамович С.Н., Мирсков Р.Г. Протатраны – эффективные биостимуляторы для сельского хозяйства, биотехнологии и микробиологии // Химия в интересах устойчивого развития. 2016. Т. 24. N 6. С. 713–729. <https://doi.org/10.15372/KhUR20160601>
6. Privalova E.A., Tiguntseva N.P., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Mirskova A.N. Tris(2-hydroxyethyl)ammonium arylchalcogenylacetates, growth stimulants of alcohol yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Russian Chemical Bulletin. 2017. Vol. 6. Issue 7. P. 1320–1324. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1893-6>
7. Adamovich S.N. New atranes and similar ionic complexes. Synthesis, structure, properties // Applied Organometallic Chemistry. 2019. Vol. 33. Issue 7. P. e4940. <https://doi.org/10.1002/aoc.4940>
8. Pavlova O.N., Adamovich S.N., Novikova A.S., Gorshkov A.G., Izosimovaa O.N., Ushakov I.A., et al. Protatranes, effective growth biostimulants of hydrocarbon-oxidizing bacteria from lake Baikal, Russia // Biotechnology Reports. 2019. Vol. 24. P. e00371. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00371>
9. Adamovich S.N., Oborina E.N. Protatranes as synthetic malting biostimulants // Russian Chemical Bulletin. 2020. Vol. 69. Issue 1. P. 179–181. <https://doi.org/10.1007/s11172-020-2742-6>
10. Лукьянова С.В., Гефан Н.Г., Адамович С.Н., Оборина Е.Н., Хаптанова Н.М., Кузнецов В.И. [и др.]. Изучение действия биологически активного соединения трис(2-гидроксиэтил)аммоний 4-хлорфенил-сульфанилацетата на рост бактерий *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus* // Acta Bio-

medica Scientifica. 2020. Т. 5. N 1. С. 47–53. <https://doi.org/10.29413/ABS.2020-5.1.6>

11. Глызина О.Ю., Адамович С.Н., Белых О.А., Суханова Л.В., Оборина Е.Н., Глызин Л.А. [и др.]. Перспективы использования синтетических биостимуляторов при развитии аквакультуры сиговых рыб озера Байкал // Известия Байкальского государственного университета. 2020. Т. 30. N 3. С. 463-471. [https://doi.org/10.17150/2500-2759.2020.30\(3\).463-471](https://doi.org/10.17150/2500-2759.2020.30(3).463-471)

12. Voronkov M.G., Dolmaa G., Tserenpil Sh., Ugtakhybayar O., Chimidsogzol A. Stimulation of barley seed germination by micromolar aqueous solutions of silatrane and cresacin // *Doklady Biological Sciences*. 2005. Vol. 404. Issue 1-6. P. 367–369. <https://doi.org/10.1007/s10630-005-0138-2>

13. Воронков М.Г., Барышок В.П. Силатраны в медицине и сельском хозяйстве. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2005. 258 с.

14. Voronkov M.G., Belousova L.I., Grigor'eva O.Yu. Vlasova N.N. Tris(2-hydroxyethyl)ammonium 4-halo-2-methylphenoxyacetates (halocresacins) // *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2014. Vol. 50. Issue 12. P. 1763–1766. <https://doi.org/10.1134/S1070428014120082>

15. Mirskova A.N., Levkovskaya G.G., Mirskov R.G., Voronkov M.G. Hydroxyalkylammonium salts of organylsulfanyl(sulfonyl)acetic. Acids – new stimulators of biological processes // *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2008. Vol. 44. Issue 10. P. 1478–1485. <https://doi.org/10.1134/S1070428008100126>

16. Kondratenko Yu.A., Kochina T.A., Fundamenskii V.S. Protic alkanolammonium ionic liquids based on triethanolammonium salts of carboxylic acids // *Glass Physics and Chemistry*. 2016. Vol. 42. Issue 6. P. 621–626. <https://doi.org/10.1134/S1087659616060092>

17. Даин И.А., Логинов С.В., Лебедев А.В., Стороженко П.А. Синтез борсодержащих производных трис (2-гидроксиэтил)аммония и их влияние на рост и развитие растений // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2017. Т. 79. N 4. С. 165–174. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2017-4-165-174>

18. Kondratenko Yu.A., Kochina T.A., Fundamenskiy V.S., Vlasov Yu.G. Triethanolammonium salts of biologically active carboxylic acids // *Russian Journal of General Chemistry*. 2015. Vol. 85. Issue 12. P. 2710–2714. <https://doi.org/10.1134/S1070363215120075>

19. Adamovich S.N., Oborina E.N., Ushakov I.A., Mirskova A.N. New method of synthesis of biologically active get(aryl)chalcogenylacetates of tris(2-hydroxyethyl)ammonium // *Russian Journal of General Chemistry*. 2018. Vol. 88. Issue 10. P. 2227–2229. <https://doi.org/10.1134/S1070363218100353>

20. Сафина Г.Ф., Филипенко Г.И. Долговечность семян при хранении и ее прогнозирование методом ускоренного старения // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2013. Т. 174. С. 123–130.

REFERENCES

1. Safina GF, Filipenko GI. Effect of heteroauxin and amber acid on germinating ability of wheat seeds after their durable storage. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal = International Research Journal*. 2018;11-1:143–147. <https://doi.org/10.23670/IRJ.2018.77.11.027> (In Russian)

2. Mirskova AN, Adamovich SN, Mirskov RG, Voronkov MG. Pharmacologically active salts and ionic liquids based on 2-hydroxyethylamines, arylchalcogenylacetic acids, and essential metals. *Russian Chemical Bulletin*. 2014;63(9):1869–1883. <https://doi.org/10.1007/s11172-014-0679-3>

3. Mirskova AN, Adamovich SN, Mirskov RG, Kolesnikova OP, Schilde U. Immunoactive ionic liquids based on 2-hydroxyethylamines and 1-R-indol-3-ylsulfanylacetic acids. Crystal and molecular structure of immunodepressant tris-(2-hydroxyethyl) ammonium indol-3-ylsulfanylacetate. *Open Chemistry*. 2015;13(1):149–155. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0018>

4. Ushakov IA, Voronov VK, Adamovich SN, Mirskov RG, Mirskova AN. The NMR study of biologically active metallated alkanol ammonium ionic liquids. *Journal of Molecular Structure* 2016;1103: 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.08.074>

5. Mirskova A.N., Adamovich S.N., Mirskov R.G. Protatranes as effective biostimulators for agricul-

ture, biotechnology, and microbiology. *Khimiya v interesakh ustoichivogo razvitiya = Chemistry for Sustainable Development*. 2016;24(6):713–729. <https://doi.org/10.15372/KhUR20160601> (In Russian)

6. Privalova EA, Tiguntseva NP, Adamovich SN, Mirskov RG, Mirskova AN. Tris(2-hydroxyethyl) ammonium arylchalcogenylacetates, growth stimulants of alcohol yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Russian Chemical Bulletin*. 2017;6(7):1320–1324. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1893-6>

7. Adamovich SN. New atranes and similar ionic complexes. Synthesis, structure, properties. *Applied Organometallic Chemistry*. 2019;33(7):e4940. <https://doi.org/10.1002/aoc.4940>

8. Pavlova ON, Adamovich SN, Novikova AS, Gorshkov AG, Izosimovaa ON, Ushakov IA, et al. Protatranes, effective growth biostimulants of hydrocarbon-oxidizing bacteria from lake Baikal, Russia. *Biotechnology Reports*. 2019;24:e00371. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00371>

9. Adamovich SN, Oborina EN. Protatranes as synthetic malting biostimulants. *Russian Chemical Bulletin*. 2020;69(1):179–181. <https://doi.org/10.1007/s11172-020-2742-6>

10. Lukyanova SV, Gefan NG, Adamovich SN, Oborina EN, Khaptanova NM, Kuznetsov VI, et al. Study of the effect of a biologically active compound

tris(2-hydroxyethyl)ammonium 4-chlorophenylsulfanylacetate on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomedica Scientifica*. 2020;5(1):47–53. <https://doi.org/10.29413/ABS.2020-5.1.6> (In Russian)

11. Glyzina OYu, Adamovich SN, Belykh OA, Sukhanova LV, Oborina EN, Glyzin LA, et al. Prospects of the use of synthetic biostimulants for the development of aquaculture of whitefishes in lake Baikal. *Izvestiya Baikal'skogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of Baikal State University*. 2020;30(3):463–471. [https://doi.org/10.17150/2500-2759.2020.30\(3\).463-471](https://doi.org/10.17150/2500-2759.2020.30(3).463-471) (In Russian)

12. Voronkov MG, Dolmaa G, Tserenpil Sh, Ugtakhbayar O, Chimidsogzol A. Stimulation of barley seed germination by micromolar aqueous solutions of silatran and cresacin. *Doklady Biological Sciences*. 2005;404(1-6):367–369. <https://doi.org/10.1007/s10630-005-0138-2>

13. Voronkov MG, Baryshok VP. *Silatranes in Medicine and Agriculture*. Novosibirsk: Izdatel'stvo SO RAN; 2005. 258 p. (In Russian)

14. Voronkov MG, Belousova LI, Grigor'eva OYu, Vlasova NN. Tris(2-hydroxyethyl)ammonium 4-halo-2-methylphenoxyacetates (halocresacins). *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2014;50(12):1763–1766. <https://doi.org/10.1134/S1070428014120082>

15. Mirskova AN, Levkovskaya GG, Mirskov RG, Voronkov MG. Hydroxyalkylammonium salts of organylsulfanyl(sulfonyl)acetic. Acids – new stimulators of biological processes. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2008;44(10):1478–1485. <https://doi.org/10.1134/S1070428008100126>

doi.org/10.1134/S1070428008100126

16. Kondratenko YuA, Kochina TA, Fundamenskii VS. Protic alkanolammonium ionic liquids based on triethanolammonium salts of carboxylic acids. *Glass Physics and Chemistry*. 2016;42(6): 621–626. <https://doi.org/10.1134/S1087659616060092>

17. Dain IA, Loginov SV, Lebedev AV, Storozhenko PA. Synthesis and plant growth modulation of tris (2-hydroxyethyl)ammonium boron-containing compounds. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologii = Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2017;79(4):165–174. (In Russian) <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2017-4-165-174>

18. Kondratenko YuA, Kochina TA, Fundamenskiy VS, Vlasov YuG. Triethanolammonium salts of biologically active carboxylic acids. *Russian Journal of General Chemistry*. 2015;85(12):2710–2714. <https://doi.org/10.1134/S1070363215120075>

19. Adamovich SN, Oborina EN, Ushakov IA, Mirskova AN. New method of synthesis of biologically active get(aryl)chalcogenylacetates of tris(2-hydroxyethyl)ammonium. *Russian Journal of General Chemistry*. 2018;88(10):2227–2229. <https://doi.org/10.1134/S1070363218100353>

20. Safina GF, Filipenko GI. Longevity of seeds at storage and its predicting by the accelerated ageing method. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2013;174:123–130. (In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Филипенко Галина Ивановна,
к.с.-х.н., заведующая лабораторией
длительного хранения генетических
ресурсов растений,
Федеральный исследовательский центр
Всероссийского института генетических
ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР),
190000, г. Санкт-Петербург,
ул. Большая Морская, 42,
Российская Федерация,
e-mail: g.filipenko@vir.nw.ru

Адамович Сергей Николаевич,
д.х.н., ведущий научный сотрудник,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: mir@irioch.irk.ru

Оборина Елизавета Николаевна,
к.х.н., старший научный сотрудник,
Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского
СО РАН,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Galina I. Filipenko,
Cand. Sci. (Agricultural Sciences),
Leading Researcher,
Head of the Laboratory for Long-Term Storage
of Plant Genetic Resources,
Federal Research Center,
N.I. Vavilov All-Russian Institute
of Plant Genetic Resources (VIR),
42, Bolshaya Morskaya St.,
St. Petersburg, 190000,
Russian Federation,
e-mail: g.filipenko@vir.nw.ru

Sergei N. Adamovich,
Dr. Sci. (Chemistry), Leading Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
✉ e-mail: mir@irioch.irk.ru

Elizaveta N. Oborina,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,

664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
e-mail: oborina@irioch.irk.ru

Розенцвейг Игорь Борисович,
д.х.н., доцент, заместитель директора
по научной работе,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация;
профессор кафедры теоретической
и прикладной органической химии
и полимеризационных процессов,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
e-mail: i_roz@irioch.irk.ru

Сафина Гузель Фаридуновна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Федеральный исследовательский центр
Всероссийского института генетических
ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР),
190000, г. Санкт-Петербург,
ул. Большая Морская, 42,
Российская Федерация,
e-mail: g.safina@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 16.02.2021.
Одобрена после рецензирования 15.04.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.*

1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: oborina@irioch.irk.ru

Igor B. Rozentsveig,
Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Deputy Director for Research,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation;
Professor, Department of Theoretical
and Applied Organic Chemistry
and Polymerization Processes,
Irkutsk State University,
1, K. Marks St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
e-mail: i_roz@irioch.irk.ru

Guzel F. Safina,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Federal Research Center N.I. Vavilov
All-Russian Institute of Plant Genetic
Resources (VIR),
42, Bolshaya Morskaya St.,
St. Petersburg, 190000,
Russian Federation,
e-mail: g.safina@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

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

*The article was submitted 16.02.2021.
Approved after reviewing 15.04.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 612.396.114:663:542

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-281-289>



Характеристика полисахаридов из корней *Eremurus hissaricus* методом ИК-Фурье спектроскопии

© А.И. Ашуров, А.С. Джонмуродов, С.Р. Усманова,
Ш.Е. Холов, З.К. Мухидинов

Институт химии им В.И. Никитина НАН Таджикистана,
г. Душанбе, Республика Таджикистан

Резюме: Структура и характеристика водорастворимых глюко- и галактоманнанов (GlcMan and GalMan), выделенных из корней нескольких родственных видов растения *Eremurus*, были изучены ранее. В этой работе дана характеристика полисахаридов и других продуктов экстракции из корнеклубней растения эремуруса гиссарского (*Eremurus hissaricus*) методом инфракрасной Фурье (ИК-Фурье) спектроскопии с помощью приставки нарушенного полного внутреннего отражения. Образцы полисахаридов были очищены от белковых веществ методом Севаджа, обесцвечены через полиамидную колонку. В ИК-Фурье спектрах основные пики, отнесенные к асимметричным и симметричным валентным колебаниям CH_2 пиранозного кольца (для GluMan – 2886, 1373, 1244 cm^{-1} ; для GalGluMan – 2923, 1370, 1238 cm^{-1}), усиливаются при очистке после удаления связанных белковых примесей. При анализе спектров образца очищенного GalGluMan в изученных полисахаридах был использован пакет прикладных программ KnowNitAll и IRPal 2. Обнаружено, что интенсивность максимума поглощения уменьшалась при 1732 cm^{-1} , в то же время при 1552,92 cm^{-1} сформировалась новая полоса, относящаяся к валентным колебаниям карбоксильных (CO) или нитрозо- (NO) групп в очищенном полисахариде, она образовалась в результате реакции Майяра между белком и восстановливающим концом полисахаридного звена. Интенсивность полос в области 1238–1244 cm^{-1} также уменьшилась в очищенных образцах, что, возможно, связано с отщеплением небольшой фракции белка. Показано, что применение ИК-Фурье спектроскопии помогло быстро и качественно охарактеризовать процесс очистки водорастворимого глюкоманнана (GluMan) и растворимого в кислоте полисахарида глюкогалактоманнана (GalGluMan) от примесей акриламида и позволило сравнительно оценить состояние функциональных групп у данных полисахаридов корнеклубней растения эремуруса гиссарского (*E. hissaricus*).

Ключевые слова: полисахариды, белки, глюкоманнан, галактоглюкоманнан, инфракрасная спектроскопия

Для цитирования: Ашуров А.И., Джонмуродов А.С., Усманова С.Р., Холов Ш.Е., Мухидинов З.К. Характеристика полисахаридов из корней *Eremurus hissaricus* методом ИК-Фурье спектроскопии. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 2. С. 281–289. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-281-289>

Characterization of polysaccharides from *Eremurus hissaricus* roots by FTIR spectroscopy

Ashurboy I. Ashurov, Abduvali S. Dzhonmurodov, Surayo R. Usmanova,
Shavkat E. Kholov, Zainiddin K. Muhidinov

V.I. Nikitin Institute of Chemistry, National Academy of Sciences of Tajikistan,
Dushanbe, Republic of Tajikistan

Abstract: The structure of water-soluble gluco- and galactomannans (GlcMan and GalMan) isolated from the roots of several *Eremurus*-related plant species has been studied previously. This article characterizes polysaccharides and other extraction products from the root tubers of *Eremurus hissaricus* by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy using an attenuated total reflectance (ATR) accessory. Polysaccharide samples were purified from protein substances with the Sevage method and discoloured through a polyamide column. In the FTIR spectra, the main peaks attributed to asymmetric and symmetric stretching vibrations of CH_2 of the pyranose ring (for GluMan – 2886, 1373, 1244 cm^{-1} ; for GalGluMan – 2923, 1370, 1238 cm^{-1}) were enhanced by purification after removing bound protein impurities. The KnowNitAll and IRPal 2 software applications were used to examine the spectra of a sample of purified GalGluMan in the stu-

died polysaccharides. The results show that the intensity of the absorption maximum decreased at 1732 cm^{-1} . At the same time, at 1552.92 cm^{-1} , a new band appeared that refers to the valence vibrations of carboxyl (CO) or nitroso (NO) groups in the purified polysaccharide. This band appeared as a result of the Maillard reaction between the protein and the reducing end of the polysaccharide unit. The intensity of the bands in the $1238\text{--}1244\text{ cm}^{-1}$ region also decreased in the purified samples, which may be due to the elimination of a small fraction of protein. The use of FTIR spectroscopy allows the process of purifying water-soluble GluMan and acid-soluble polysaccharide of GalGluMan from acrylamide impurities to be characterized timely and accurately. Additionally, this method allows a comparative estimation of functional groups in polysaccharides of the root tubers of *E. hissaricus*.

Keywords: polysaccharides, proteins, glucomannan, galactoglucomannan, infrared spectroscopy

Для цитирования: Ashurov AI, Dzhonmuroov AS, Usmanova SR, Kholov SE, Muhidinov ZK. Characterization of polysaccharides from *Eremurus hissaricus* roots by FTIR spectroscopy. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):281–289. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-281-289>

ВВЕДЕНИЕ

Эремурус (*Eremurus*) – род многолетних травянистых растений семейства Асфodelовые (Asphodelaceae). Эти растения с крупной удлиненной цветочной кистью, несущей цветки ярких оттенков, являются активными медоносами, они очень декоративны и популярны в садоводстве.

На территории Республики Таджикистан произрастает 29 из более чем 60 известных в мире видов эремуруса¹. Многие виды этого растения, представленные во флоре Таджикистана, в том числе эремурус гиссарский – *Eremurus hissaricus*, имеют практическое значение, поскольку широко применяются в медицине, а из некоторых видов эремуруса изготавливают красители для тканей и клей.

В народной медицине корни этого растения применялись при зубной боли, укусах змей и скорпионов, а также при водянке, а его смесь с винным осадком – как наружное средство для лечения злокачественных язв и др. Об использовании эремуруса в качестве лечебного средства упоминалось еще в средневековых источниках (например, в «Каноне медицины» Абу Али ибн Сина (Авиценна)). В современной медицине корни эремуруса применяют и как слабительное, мочегонное средство при заболеваниях органов ЖКТ, спиртовые экстракты обладают противовоспалительными, противоопухолевыми, антибактериальными свойствами. Обнаруженный в корнях эремуруса новый полисахарид – эремуран, имеет эмульгирующие, обволакивающие и клеящие свойства. В его состав входит манноза, применяемая для лечения некоторых вирусных заболеваний.

Структура и характеристики водорастворимых глюко- и галактоманнанов (GlcMan & GalMan), выделенных из корней нескольких родственных видов *Eremurus*, были изучены ранее. Это такие виды, как *E. regelii* Vved., *E. iae*, *E. anisopterus*, *E. spectabilis* и *E. stenophyllus*,

произрастающие в Узбекистане [1], России [2], Китае [3] и Иране [4]. Многие из этих полисахаридов являются линейными и частично ацетилированными глюкоманнанами с различным содержанием D-глюкозы, D-маннозы и ацетильных групп. Содержание перечисленных составляющих соответственно, %, у: *E. Regelii* – 32,5, 65,0 и 2,3; *E. iae* – 28,8, 69,0 и 2,2; *E. spectabilis* – 25,6 и 74,4, ацетильные группы не обнаружены.

Результаты структурного анализа (¹³C ЯМР-спектроскопия) для каждого из них оказались очень схожими и выявили присутствие 1,4-β-гликозидной связи и сложноэфирных карбонильных групп. Независимо от своего происхождения GlcMan состоит из β-1,4 связанных мономеров D-маннозы и D-глюкозы [4]. Однако соотношение мономеров маннозы / глюкозы может варьироваться в зависимости от исходного источника GlcMan, как было обнаружено для данного полисахарида, выделенного из растения конжак [5].

Поэтому было интересно исследовать тонкую структуру полисахаридов одного из видов растения – эремуруса гиссарского (*Eremurus hissaricus*), который произрастает в высокогорьях Центрального Таджикистана (Биологическая станция НАН РТ, Сиякух). В предыдущих работах приведены результаты определения содержания биологически активных компонентов, выделенных из корней *E. hissaricus* в разные вегетационные периоды [6], представлена основная структура и молекулярные характеристики полисахаридов, экстрагированных водой и кислым раствором с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и ЯМР-спектроскопии [7].

В данной статье представлены результаты детального анализа ИК-Фурье спектров образцов полисахарида для сравнительной оценки состояния функциональных групп и подтверждения наличия гликозидных связей, а также на присутствие посторонних примесей в процессе очистки в вышеуказанных образцах.

¹*Eremurus hissaricus* Vved. // Плонтариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений. 2007—2021. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.plantarium.ru/page/view/item/14914.html> (15.01.2021).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования явились бутанол-хлороформный экстракт из водорастворимого полисахарида; водорастворимый полисахарид (ВРП) и кислоторастворимый полисахарид (КРП).

Выделение и очистка полисахаридов. Образцы полисахаридов, экстрагированных из *E. hissaricus* в фазе бутонизации, были подвергнуты тонкой очистке с целью изучения их структуры (методика очистки полисахаридов описана в работах [6, 7]). После выделения водорастворимого полисахарида белковая часть была изолирована из раствора полисахарида методом Севаджа с применением смеси бутанол : хлороформ (1:4) [8]. Таким образом, выделенная белковая фракция первоначально была проанализирована методом колебательной инфракрасной спектроскопии (ИК-спектроскопии), далее все образцы были повторно очищены методом колоночной хроматографии (колонки размером 2,5×50 см (Econo-Column®)) на основе полиамида, который используется для депротеинизации и обесцвечивания полисахаридов [9, 10]. Полиамид (40 г) (Sigma-Aldrich, США) выдерживали 16 ч в деионизированной воде для удаления пузырьков воздуха.

Полисахариды элюировали со скоростью потока 3,5 мл/мин в соответствии с процедурой, описанной в работе [10]. Содержание протеинов в исходных и очищенных образцах определяли с помощью метода Бредфорда [11]. Концентрацию полисахарида в элюентах, после полного гидролиза, контролировали с помощью фенолсернистого метода [12].

Характеристика полисахаридов с помощью ИК-Фурье спектроскопии. Для проведения ИК-Фурье спектроскопии образцы полисахаридов предварительно были высушены при 110 °С в

течение 30 мин. ИК-Фурье спектры были сняты на FTIR-спектрометре Nicolet™ iS™ 50 (Япония), оснащенном встроенной приставкой нарушенно-полного внутреннего отражения (НПВО – ATR) с алмазным кристаллом для ближнего, среднего и дальнего ИК-диапазона. Необходимые функции для управления прибором контролируются программным обеспечением Omnic (Thermo Scientific). Для каждого материала пять образцов при одних и тех же условиях были сканированы в спектральном диапазоне 400–4000 см⁻¹ с разрешением 2 см⁻¹ в формате светопропускания (128 повторностей). Устройство контроля давления обеспечивало хороший контакт между образцом и кристаллом. Фоновый спектр был получен на воздухе. ИК-Фурье спектры были анализированы с помощью пакета прикладных программ KnowitAll и IRPal 2.0 [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ИК-спектрах белковых веществ, полученных из экстракта бутанол-хлороформ, обнаружено присутствие акриламида, что было подтверждено путем сравнения спектральных полос с полосами акриламидного стандарта (Sigma) (рис. 1). За исключением двух пиков низкой интенсивности – при 2854 и 2968 см⁻¹, спектры экстракта полностью соответствовали ИК-спектру акриламида.

В работе [14] отмечено, что присутствие акриламида было обнаружено в готовых продуктах и кулинарных блюдах (хлеб, чипсы, хлопья, картофель фри и др.) после термической обработки соответствующих растительных материалов при высокой температуре. В то же время в работе [15] показано, что аспарагин в присутствии редуцирующих сахаров способен образовывать акриламид в дополнение к малеимиду.

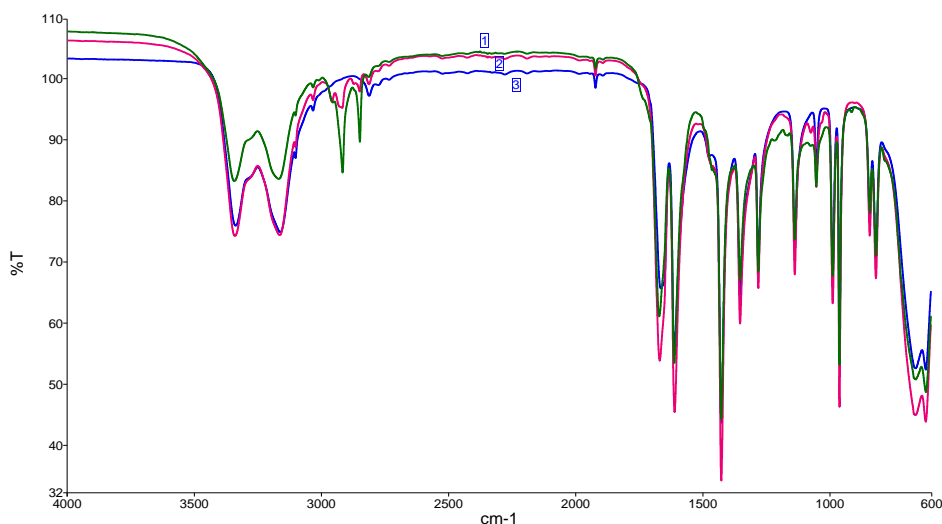


Рис. 1. ИК-Фурье спектры фракции экстрагированной смесью бутанол-хлороформ из сухих (1) и свежих (2) корнеклубней *E. hissaricus* и спектр стандартного образца акриламида (3)

Fig. 1. FT-IR spectra of butanol-chloroform extract from dry (1) and fresh (2) *E. hissaricus* root tubers and the spectrum of a standard acrylamide sample (3)

Таким образом, очищенные образцы полисахаридов высушивали и проводили детальный анализ их структуры и молекулярной массы. Моносахаридный состав ВРП и КРП анализировали с помощью высокоэффективной анионной хроматографии с амперометрическим детектором (НРАЕС-PAD). Молекулярная масса и структура полисахаридов были установлены с помощью метода многоугольного лазерного светорассеяния (Multiangle Light Scattering – MALS), а также 1D и 2D ЯМР-спектроскопией, что позволило сделать вывод о том, что корни *E. hissaricus* содержат водорастворимый глюкоманнан (GluMan) и растворимые в кислоте полисахариды глюкогалактоманнана (GalGluMan) [7].

Сравнительное исследование полисахаридов с помощью ИК-спектроскопии. На рис. 2 представлены ИК-спектры GluMan и GalGluMan до и после очистки. Полисахаридные фрагменты в этих образцах обнаруживаются по ряду харак-

терных колебательных полос функциональных групп и основного ядра полисахаридного матрикса в ИК-спектрах [16–19].

Наличие широких полос при 3352,21 и 3351,25 см⁻¹ указывает на валентные колебания О–Н-групп сахаров. Эти полосы сдвигаются в сторону коротковолнового диапазона спектров 3296,71 и 3229,53 см⁻¹ соответственно вследствие удаления белковой молекулы и возникновения водородных связей с соседними О–Н-группами или между полисахаридными цепями. Узкие полосы при 2923,15 и 2886,00 см⁻¹ относятся к диапазону частот валентных колебаний –СН эфирных групп (метила или ацетила). Полоса поглощения при частоте $\nu = 2927$ см⁻¹ отражает СН-валентные асимметричные колебания метиленовой группы $\nu_a(\text{CH}_2)$, а локальные максимумы на частотах 2886 и 2885 см⁻¹ относятся к симметричному типу данных колебаний.

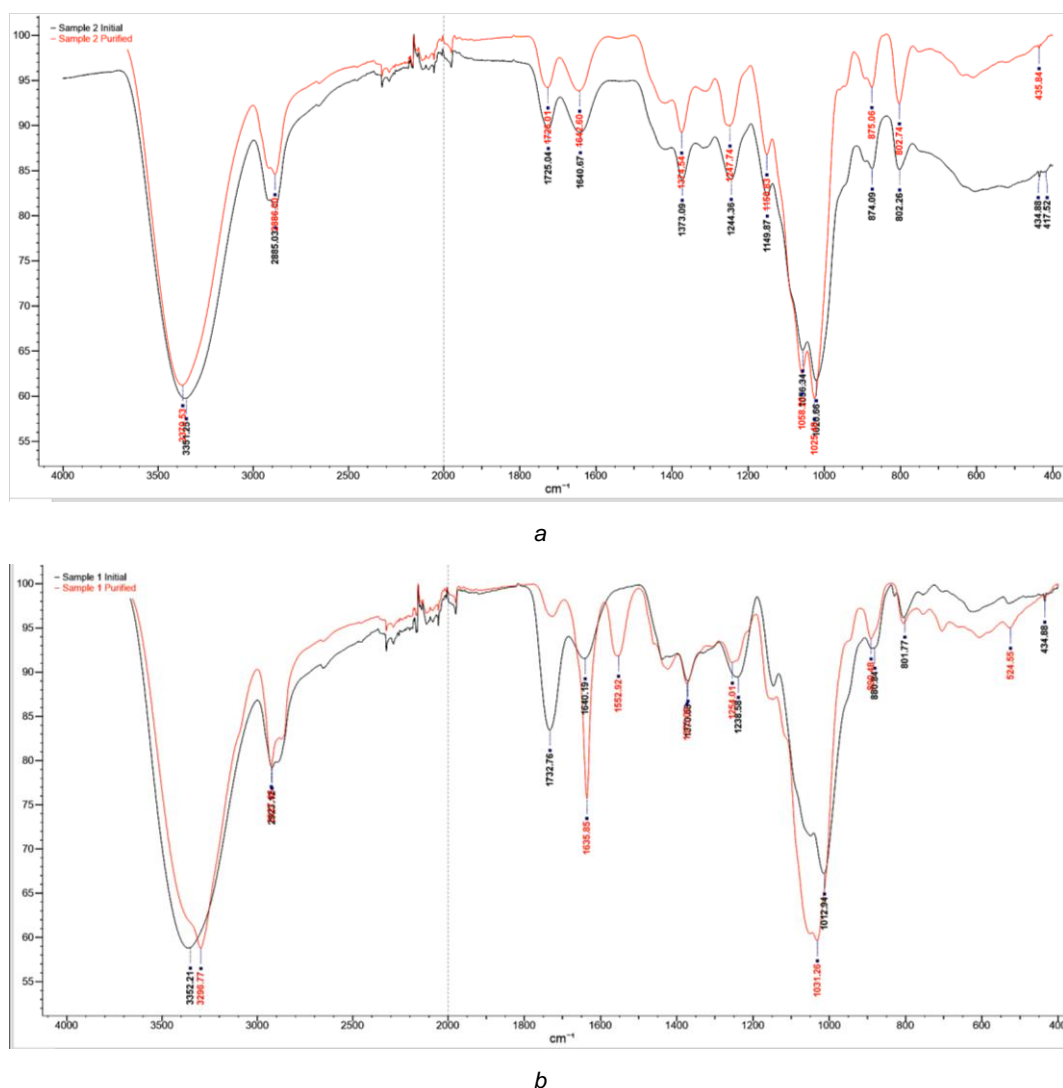


Рис. 2. ИК-Фурье спектры образцов полисахаридов GluMan (a) и GalGluMan (b) до (черные линии) и после (оранжевые линии) очистки

Fig. 2. FT-IR spectra of polysaccharides GluMan (a) and GalGluMan (b) before (black line) and after (orange line) purification

Валентные колебания карбонильных групп (CO) наблюдаются для неочищенных образцов GluMan и GalGluMan при 1725–1732 и 1635–1640 см⁻¹ соответственно, а область 1000–1200 см⁻¹ относится к глюкозидным колебаниям C–O–C и углеводного скелета. В спектрах обоих полисахаридов можно заметить существенные различия в интенсивности полос поглощения и степени этерификации (в основном ацетильных групп, как было установлено в работе [7]), а также интенсивность, форму и соотношение инфракрасных полос, расположенных около 1726 см⁻¹ (C=O, валентные колебания сложноэфирных карбонильных групп) для GluMan, 1732 см⁻¹ – для GalGluMan, и в области 1642, 1636 см⁻¹ (валентные колебания карбоксилата иона COO⁻) – для GluMan и GalGluMan соответственно. Рассчитанное количество этерифицированных карбонильных групп из отношения площадей соответствующих пиков ($C\bar{E} = S_{1725} / (S_{1725} + S_{1640}) \cdot 100\%$) составило 45,44% – для GluMan, 79,95% – для GalGluMan полисахаридов.

Наконец, основные пики, отнесенные к симметричным и асимметричным валентным колебаниям CH₂ пиранозного кольца (для GluMan – 2886, 1373, 1244 см⁻¹, для GalGluMan – 2923, 1370, 1238 см⁻¹), по-видимому, усиливаются при очистке, поскольку в процессе очистки связанные белковые примеси удаляются.

Слабые полосы при 874 и 802 см⁻¹ в ИК-спектре GluMan относятся к деформационным валентным колебаниям C–H связей в β-пиранозной форме D-глюкозы и D-маннозы. Причем эта важная область ИК-спектров позволяет определить содержание полисахаридов в растительном материале путем суммирования площадей этих пиков (при 873 и 812 см⁻¹ – для GluMan; 880 см⁻¹ – для GalGluMan), которые представляют деформационные колебания C–H связей, характерных для D-маннозы [19], что указывает на ее присутствие в полисахариде как в β-, так и в α-конфигурациях [2–4]. Этот вывод согласуется с результатами анализа других видов *Eremurus*, произрастающих в России [2] и Иране [4], для которых комбинация этих пиков считается характерной для D-маннозы, находящейся в полисахаридах в β-конфигурации. Присутствие β-1,4-глюкозидных и β-1,4-маннозидных связей в GluMan связывают с валентными колебаниями C–O–C, расположенными в областях 1068, 1025 и 1244 см⁻¹ [4, 7].

Слабые полосы при 1274 и 1264 см⁻¹ были отнесены к ацетильным и метильным группам полисахаридов GluMan и GalGluMan соответственно.

Метильная и ацетильная составляющие полисахаридов были изучены методом ЯМР-спектроскопии [7]. К сожалению, желаемый кросс-пик, связь этих групп с соответствующим сахарным остатком в ЯМР НМВС-спектрах было трудно обнаружить из-за неблагоприятных релаксационных свойств и слабого связывания.

В результате анализа спектров образца очищенного GalGluMan в исследуемых полисахаридах установлено, что интенсивность максимума поглощения уменьшалась при 1732 см⁻¹, в то время как при $\nu = 1552,92$ см⁻¹ сформировалась новая полоса, соответствующая колебанию N–H связей Амид-II и относящаяся, вероятно, к свободной молекуле белка. Этот пик был проанализирован с использованием программного обеспечения IR Pal (рис. 3) и обозначен как валентное колебание карбоксильных (CO) или нитрозо (N=O) групп в очищенном полисахариде, которое образовалось в результате реакции Майяра между белком и восстанавливающим концом полисахаридного звена. Интенсивность полос в области 1238–1244 см⁻¹ также уменьшилась в очищенных образцах, что, возможно, связано с отщеплением небольшой фракции белка.

В соответствии с другой поисковой системой эта полоса указала на присутствие функциональных групп белка: аминной (R-NH₂) и амидной (R-CONH₂) групп, которые были отнесены к NH₂ и NH валентным колебаниям как белка, так и белка полисахаридного конъюгата (таблица).

Другим открытием в спектрах поглощения ИК-Фурье является уменьшение интенсивности пика в области 1725–1734 см⁻¹, характерного на наличие связи C=O сложноэфирного конъюгата, что позволяет однозначно заключить, что исследуемый образец GalGluMan высвобождается из белкового комплекса. Полосы при 801 см⁻¹ в GalGluMan были отнесены к α-пиранозной конфигурации сахарного звена, что подтверждается присутствием остатков рамнозы, связанных в боковые цепи GalGluMan полисахарида, в то время как поглощение в области 880–890 см⁻¹ подтверждает наличие β-пиранозной конфигурации другого сахарного остатка, т.е. маннозы или глюкозы.

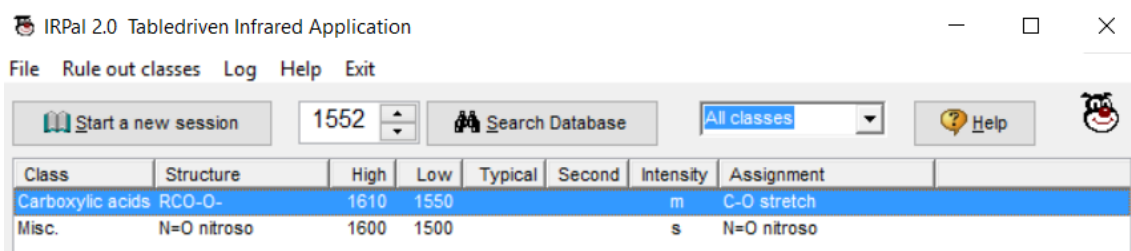


Рис. 3. Анализ полос поглощения при $\nu = 1552$ см⁻¹ с использованием поисковой программы IR Pal

Fig. 3. Analysis of absorption bands at the $\nu = 1552$ cm⁻¹ using the IR Pal search Database

Анализ спектральной полосы с помощью информационной системы KnowitAll.

Spectral Band Analysis Using KnowitAll Database

| Соединение | Функциональная группа | Пик, см ⁻¹ | | Характерно для связей |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------|-------------------------|
| Карбоновая кислота | RCO-O- | 1610 (с) | 1550 (ср.) | C–O валентных колебаний |
| Смешанные соединения | N=O | 1600 (с) | 1550 (ср.) | N=O нитрозосоединений |
| Карбоновая кислота | RCO-O- | 1405 (ср.) | 1395 (с) | C–O валентных колебаний |

ВЫВОДЫ

Использование в данном исследовании ИК-спектроскопии способствовало качественно охарактеризовать процесс очистки полисахаридов от белковой фракции. В ИК-спектрах белковых веществ, полученных из экстракта бутанол-хлороформ, обнаружено присутствие акриламида. Это было подтверждено путем сравнения спектральных полос с полосами стандарта акриламида (Sigma).

Анализ ИК-Фурье спектров с применением пакета прикладных программ KnowitAll и IRPal 2.0 позволил оценить отщепление белковых примесей от полисахаридного матрикса в процессе очистки. Показано, что основные пики, отнесенные к

асимметричным и симметричным валентным колебаниям CH₂ пиранозного кольца (для GluMan – 2886, 1373, 1244 см⁻¹, для GalGluMan – 2923, 1370, 1238 см⁻¹), усиливаются из-за удаления белковых примесей в процессе очистки полисахаридов. Это уменьшает интенсивность пика в области 1725–1734 см⁻¹, характерного на наличие связи C=O сложноэфирного конъюгата с белками.

Таким образом, полученные результаты дополняют данные о структуре двух полисахаридов – глюкоманна (GluMan) и глюкогалактоманна (GalGluMan) [7], они также позволили оценить состояние функциональных групп у изолированных полисахаридов корнеклубня *E. hissaricus*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rakhimov D.A., Yuldashev N.P. Polysaccharides of *Eremurus* XXIX. Isolation of a glucomannan // Chemistry of Natural Compounds. 1996. Vol. 32. Issue 4. P. 587–588. <https://doi.org/10.1007/BF01372621>
2. Smirnova N.I., Mestechkina N.M., Shcherbukhin V.D. The structure and characteristics of glucomannans from *Eremurus iae* and *E. zangezurus*: assignment of acetyl group localization in macromolecules // Applied Biochemistry and Microbiology. 2001. Vol. 37. Issue 3. P. 287–291. <https://doi.org/10.1023/A:1010237419780>
3. Hu C., Kong Q., Yang D., Pan Y. Isolation and structural characterization of a novel galactomannan from *Eremurus anisopterus* (Ker. et Kir) Regel roots // Carbohydrate Polymers. 2011. Vol. 84. Issue 1. P. 402–406. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.054>
4. Beigi M., Jahanbin K. A water-soluble polysaccharide from the roots of *Eremurus spectabilis* M. B. subsp. *spectabilis*: Extraction, purification and structural features // International Journal of Biological Macromolecules. 2019. Vol. 128. P. 648–654. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.178>
5. Maeda M., Shimahara H., Sugiyama N. Detailed Examination of the Branched Structure of Konjac Glucomannan // Agricultural and Biological Chemistry. 1980. Vol. 44. Issue 2. P. 245–252. <https://doi.org/10.1080/00021369.1980.10863939>
6. Ашуров А.И., Усманова С.Р., Мухидинов З.К., Лиу Л.Ш. Биологически активные компоненты корня эремуруса гиссарского (*E. hissaricus*) // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2018. N 1 (361). С. 35–38.
7. Muhidinov Z.K., Bobokalonov J.T., Ismoilov I.B., Strahan G.D., Chau H.K., Hotchkiss A.T., et al. Characterization of two types of polysaccharides from *Eremurus hissaricus* roots growing in Tajikistan // Food Hydrocolloids. 2020. Vol. 105. Issue 10. P. 105768. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105768>
8. Staub A.M. Removal of proteins: Sevag method. In: Whistler R.L., Bemiller J.N., Wolfrom M.L. (eds.). Methods in Carbohydrate Chemistry. V. General Polysaccharides. New York: Academic Press, 1965. P. 5–6.
9. Cai W., Xie L., Chen Y., Zhang H. Purification, characterization and anticoagulant activity of the polysaccharides from green tea // Carbohydrate Polymers. 2013. Vol. 92. Issue 2. P. 1086–1090. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.057>
10. Jiang H., Sun P., He J., Shao P. Rapid purification of polysaccharides using novel radial flow ion-exchange by response surface methodology from *Ganoderma lucidum* // Food and Bioprocess Technology. 2012. Vol. 90. Issue 1. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.12.001>
11. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 72. Issue 1-2. P. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
12. Cuesta G., Suarez N., Bessio M.I., Ferreira F., Massaldi H. Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol-sulfuric acid method // Journal of Microbiological Methods. 2003. Vol. 52. Issue 1. P. 69–73. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00151-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00151-3)
13. Ayvaz H., Rodriguez-Saona L.E. Application

of handheld and portable spectrometers for screening acrylamide content in commercial potato chips // *Food Chemistry*. 2015. Vol. 174. P. 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.001>

14. Yaylayan V.A., Wnorowski A, Locas C.P. Why Asparagine Needs Carbohydrates To Generate Acrylamide // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. Vol. 51. Issue 6. P.1753–1757. <https://doi.org/10.1021/jf0261506>

15. Kacurakova M., Capek P., Sasinkova V., Wellner N., Ebringerova A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses // *Carbohydrate Polymers*. 2000. Vol. 43. Issue 2. P.195–203. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X)

16. Coimbra M.A., Barros A.S., Rutledge D.N., Delgado I. FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts // *Carbohydrate Research*. 1999. Vol. 317.

Issue 1-4. P. 145–154. [https://doi.org/10.1016/S008-6215\(99\)00071-3](https://doi.org/10.1016/S008-6215(99)00071-3)

17. Wellner N., Kacurakova M., Malovikova A., Wilson R.H., Belton P.S. FT-IR study of pectate and pectinate gels formed by divalent cations // *Carbohydrate Research*. 1998. Vol. 308. Issue 1-2. P. 123–131. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00065-2)

18. Da Silva D.F., Ogawa C.Y.L., Sato F., Neto A.M., Larsen F.H., Matumoto-Pintro P.T. Chemical and physical characterization of Konjac glucomannan-based powders by FTIR and ¹³C MAS NMR // *Powder Technology*. 2020. Vol. 361. P. 610–616. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.11.071>

19. Acemi A., Çobanoğlu Ö., Türker-Kaya S. FTIR-based comparative analysis of glucomannan contents in some tuberous orchids, and effects of pre-processing on glucomannan measurement // *Journal of the Science of Food Agriculture*. 2019. Vol. 99. Issue 7. P. 3681–3686. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9596>

REFERENCES

1. Rakhimov DA, Yuldashev NP. Polysaccharides of *Eremurus* XXIX. Isolation of a glucomannan. *Chemistry of Natural Compounds*. 1996;32(4):587–588. <https://doi.org/10.1007/BF01372621>

2. Smirnova NI, Mestechkina NM, Shcherbukhin VD. The structure and characteristics of glucomannans from *Eremurus iae* and *E. zangezuristicus*: assignment of acetyl group localization in macromolecules. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2001; 37(3):287–291. <https://doi.org/10.1023/A:1010237419780>

3. Hu C, Kong Q, Yang D, Pan Y. Isolation and structural characterization of a novel galactomannan from *Eremurus anisopterus* (Ker. et Kir) Regel roots. *Carbohydrate Polymers*. 2011;84(1):402–406. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.054>

4. Beigi M, Jahanbin K. A water-soluble polysaccharide from the roots of *Eremurus spectabilis* M. B. subsp. *spectabilis*: Extraction, purification and structural features. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;128:648–654. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.178>

5. Maeda M, Shimahara H, Sugiyama N. Detailed Examination of the Branched Structure of Konjac Glucomannan. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1980;44(2):245–252. <https://doi.org/10.1080/00021369.1980.10863939>

6. Ashurov AI, Usmanova SR, Mukhidinov ZK, Liu LSh. Biologically active components of the *eremurus hissaricus* root. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Pishchevaya tekhnologiya = News of institutes of higher education. Food Technology*. 2018;1:35–38. (In Russian)

7. Muhidinov ZK, Bobokalonov JT, Ismoilov IB, Strahan GD, Chau HK, Hotchkiss AT, et al. Characterization of two types of polysaccharides from *Eremurus hissaricus* roots growing in Tajikistan. *Food Hydrocolloids*. 2020;105(10):105768. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105768>

10.1016/j.foodhyd.2020.105768

8. Staub AM. Removal of proteins: Sevag method. In: Whistler RL, Bemiller JN, Wolfrom ML (eds.). *Methods in Carbohydrate Chemistry*. V. General Polysaccharides. New York: Academic Press; 1965. p. 5–6.

9. Cai W, Xie L, Chen Y, Zhang H. Purification, characterization and anticoagulant activity of the polysaccharides from green tea. *Carbohydrate Polymers*. 2013;92(2):1086–1090. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.057>

10. Jiang H, Sun P, He J, Shao P. Rapid purification of polysaccharides using novel radial flow ion-exchange by response surface methodology from *Ganoderma lucidum*. *Food and Bioprocess Technology*. 2012;90(1):1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.12.001>

11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1-2):248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

12. Cuesta G, Suarez N, Bessio MI, Ferreira F, Massaldi H. Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol-sulfuric acid method. *Journal of Microbiological Methods*. 2003;52(1):69–73. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00151-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00151-3)

13. Ayvaz H, Rodriguez-Saona LE. Application of handheld and portable spectrometers for screening acrylamide content in commercial potato chips. *Food Chemistry*. 2015;174:154–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.001>

14. Yaylayan VA, Wnorowski A, Locas CP. Why Asparagine Needs Carbohydrates To Generate Acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(6):1753–1757. <https://doi.org/10.1021/jf0261506>

10.1021/jf0261506

15. Kacurakova M, Capek P, Sasinkova V, Wellner N, Ebringerova A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*. 2000;43(2):195–203. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X)

16. Coimbra MA, Barros AS, Rutledge DN, Delgadillo I. FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts. *Carbohydrate Research*. 1999;317(1-4):145–154. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00071-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00071-3)

17. Wellner N, Kacurakova M, Malovikova A, Wilson RH, Belton PS. FT-IR study of pectate and pectinate gels formed by divalent cations. *Carbohydrate Research*. 1998;308(1-2):123–131. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00065-2)

18. Da Silva DF, Ogawa CYL, Sato F, Neto AM, Larsen FH, Matumoto-Pintro PT. Chemical and physical characterization of Konjac glucomannan-based powders by FTIR and ¹³C MAS NMR. *Powder Technology*. 2020;361:610–616. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.11.071>

19. Acemi A, Çobanoğlu Ö, Türker-Kaya S. FTIR-based comparative analysis of glucomannan contents in some tuberous orchids, and effects of pre-processing on glucomannan measurement. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 2019;99(7):3681–3686. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9596>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ашуров Ашурбой Ильхомович,

докторант,
Институт химии им. В.И. Никитина
НАН Таджикистана,
734063, г. Душанбе, ул. Аини, 299/2,
Республика Таджикистан,
e-mail: ashurboy_1593@mail.ru

Джонмуродов Абдували Саломович,

к.х.н., ведущий научный сотрудник
лаборатории химии высокомолекулярных
соединений,
Институт химии им. В.И. Никитина
НАН Таджикистана,
734063, г. Душанбе, ул. Аини, 299/2,
Республика Таджикистан,
e-mail: abduvalid@mail.ru

Усманова Сураё Рахматжановна,

к.х.н., ведущий научный сотрудник
лаборатории химии высокомолекулярных
соединений,
Институт химии им. В.И. Никитина
НАН Таджикистана,
734063, г. Душанбе, ул. Аини, 299/2,
Республика Таджикистан,
e-mail: surayo.usmanova@gmail.com

Холов Шавкат Ерович,

к.т.н., старший научный сотрудник
лаборатории химии высокомолекулярных
соединений,
Институт химии им. В.И. Никитина
НАН Таджикистана,
734063, г. Душанбе, ул. Аини, 299/2,
Республика Таджикистан,
e-mail: shavkat.kholov@yandex.ru

Мухидинов Зайниддин Камарович,

д.х.н., профессор, главный научный сотрудник
лаборатории химии
высокомолекулярных соединений,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ashurboy I. Ashurov,

Doctoral Student,
V.I. Nikitin Institute of Chemistry,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Aini St., Dushanbe, 734063,
Republic of Tajikistan,
e-mail: ashurboy_1593@mail.ru

Abduvali S. Dzhonmurodov,

Cand. Sci (Chemistry), Leading Researcher
Laboratory of Biopolymers,
V.I. Nikitin Institute of Chemistry,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Aini St., Dushanbe, 734063,
Republic of Tajikistan,
e-mail: abduvalid@mail.ru

Surayo R. Usmanova,

Cand. Sci (Chemistry), Leading Researcher,
Laboratory of Biopolymers,
V.I. Nikitin Institute of Chemistry,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Aini St., Dushanbe, 734063,
Republic of Tajikistan,
e-mail: surayo.usmanova@gmail.com

Shavkat E. Kholov,

Cand. Sci. (Engineering), Senior Scientist,
Laboratory of Biopolymers,
V.I. Nikitin Institute of Chemistry,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Aini St., Dushanbe, 734063,
Republic of Tajikistan,
e-mail: shavkat.kholov@yandex.ru

Zainiddin K. Muhidinov,

Dr. Sci. Chemistry), Professor,
Chief Researcher,
Laboratory of Biopolymers,

Институт химии им. В.И. Никитина
НАН Таджикистана,
734063, г. Душанбе, ул. Айна, 299/2,
Республика Таджикистан,
✉ e-mail: zainy@mail.ru

V.I. Nikitin Institute of Chemistry,
National Academy of Sciences of Tajikistan,
299/2, Aini St., Dushanbe, 734063,
Republic of Tajikistan,
✉ e-mail: zainy@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

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

*Поступила в редакцию 08.02.2021.
Одобрена после рецензирования 11.05.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.*

*The article was submitted 08.02.2021.
Approved after reviewing 11.05.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 637.3: 637.1

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-290-298>



Влияние пробиотических культур и липолитических ферментов на свойства молочного продукта в разрабатываемой биотехнологии сыра

© Ю.Г. Стурова*, А.В. Гришкова***, В.В. Коньшин*

*Алтайский государственный технический университет,
г. Барнаул, Российская Федерация

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

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

Резюме: Целью работы являлась оценка влияния пробиотических микроорганизмов и прегастральной липазы на органолептические и биохимические показатели мягкого сыра, изготовленного из смеси молока и пахты. В ходе проведения исследований стояла задача выяснить, как температура и продолжительность выдержки при данной температуре влияют на рост и развитие лакто- и бифидобактерий, а также на их количество в готовом продукте. Для того чтобы повысить биологическую и пищевую ценность разрабатываемого мягкого сыра, в смесь для его производства ввели белково-углеводное сырье, богатое витаминами А, В₁₂, Д, Е, фосфатидами и минеральными веществами. Введением в состав пахты удалось повысить биологическую ценность продукта и добиться получения более мягкой консистенции. Для улучшения вкуса сыра и получения требуемой консистенции применялся препарат прегастральной липазы, который широко используется в сыродельной промышленности при выработке различных сыров с высокой и низкой температурой второго нагревания. В результате направленного липолиза в готовом продукте накапливаются свободные жирные кислоты, диацилглицерины, играющие роль пластификаторов и влияющие на консистенцию и органолептические показатели сыра. Установлено, что при комбинировании пахты и молока в оптимальном соотношении, а также при внесении липазы получается продукт с наилучшими физико-химическими показателями и максимальной оценкой по органолептическим характеристикам. В присутствии пробиотической закваски (при наличии готового субстрата) начинается активный синтез ферментов, необходимых для полного цикла гидролиза молочного жира. Все это в итоге позволяет создать продукт функционального назначения.

Ключевые слова: функциональные продукты, прегастральные липазы, водорастворимые жирные кислоты, липолиз, органолептическая оценка сыра

Благодарности: Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки РФ (государственное задание № 075-00316-20-01 от 21.02.2020; мнемокод 0611-2020-013; номер темы FZMM-2020-0013).

Для цитирования: Стурова Ю.Г., Гришкова А.В., Коньшин В.В. Влияние пробиотических культур и липолитических ферментов на свойства молочного продукта в разрабатываемой биотехнологии сыра. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 2. С. 290–298. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-290-298>

The effect of probiotic crops and lipolytic enzymes on the properties of dairy products in the cheese biotechnology under development

Yuliay G. Sturova*, Anastasiya V. Grishkova***, Vadim V. Konshin*

*Altai State Technical University,
Barnaul, Russian Federation

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

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

Abstract: This article aims to evaluate the influence of probiotic microorganisms and pregastric lipase on organoleptic and biochemical characteristics of soft cheese made from a mixture of milk and buttermilk. The study was designed to determine how the temperature and exposure at this temperature affect the growth and development of lactose and bifidobacteria, as well as their quantity in the finished product. In order to increase the biological and nutritional value of the developed soft cheese, protein-carbohydrate raw materials rich in vitamins A, B₁₂, D, E, phosphate and minerals were introduced into the production mixture. The addition of buttermilk increased the biological value of the product and improved its consistency. The taste and consistency of cheese was improved by a pregastric lipase preparation, widely used in the cheese-making industry for production of various cheeses with high and low temperatures of the second heating. As a result of directed lipolysis, the finished product accumulates free fatty acids and diacylglycerols, acting as plasticizers and affecting the texture and organoleptic characteristics of the cheese. The results show that combining buttermilk and milk in an optimal ratio and addition of lipase produce a product with the best physicochemical parameters and a maximum evaluation of organoleptic characteristics. In the presence of a probiotic starter culture (provided there is a ready-made substrate), an active synthesis of enzymes necessary for the complete hydrolysis of milk fat begins. This all creates a functional product.

Keywords: functional products, pregastric lipases, water-soluble fatty acids, lipolysis, organoleptic evaluation of cheese

Acknowledgement: The work was carried out within the framework of the State task of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (State task no. 075-00316-20-01 of 21.02.2020; mnemonic code 0611-2020-013; topic number FZMM-2020-0013).

For citation: Sturova Yu, Grishkova AV, Konshin VV. The effect of probiotic crops and lipolytic enzymes on the properties of dairy products in the cheese biotechnology under development. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2021;11 (2):290–298. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-290-298>

ВВЕДЕНИЕ

Проблема здорового образа жизни, в том числе рационального питания, является актуальной не только в нашей стране, но и во всем мире. У значительной части населения, согласно статистическим данным, рацион не соответствует принципам здорового питания из-за потребления пищевых продуктов, содержащих большое количество простых углеводов и жира животного происхождения, недостатка в меню овощей и фруктов, рыбы и морепродуктов, а также продуктов, обогащенных про- и пребиотиками. Неправильное питание провоцирует возникновение и развитие многих заболеваний, в первую очередь ожирения: увеличение массы тела приводит к нарушению белкового обмена, что в свою очередь является причиной многих недугов. С количеством и качеством еды непосредственно связан и сахарный диабет. Заболевания пищеварительной (язвенная болезнь, гастрит и др.) и сердечно-сосудистой (атеросклероз, гипертония, стенокардия) систем – прямое следствие неправильного питания [1, 2]. Нельзя забывать об авитаминозе, поскольку количество людей, страдающих недостатком витаминов, растет с каждым годом.

Кроме того, на состоянии здоровья населения всех возрастных групп сказывается все более ухудшающаяся экологическая обстановка. Такие масштабные экологические проблемы современного мира, как парниковый эффект и глобальное потепление, загрязнение воздуха, почвы и воды, истощение озонового слоя, перенаселение планеты и многие другие отражаются на функциониро-

вании всех органов и систем организма человека, вызывают интоксикацию, приводят к нарушению репродуктивной функции. Данные статистики говорят о том, что растет число детей с генетическими отклонениями, происходит «омоложение» онкологических заболеваний [3, 4].

Нужно отметить, что сегодня люди стали осознавать роль пищи в своей жизни и понимать, что правильная еда помогает поддерживать здоровье и продлевает жизнь. И здесь очень важна просветительская работа среди различных групп населения.

Важной задачей в области здорового питания, которую нужно решать на государственном уровне, является развитие пищевой отрасли в направлении производства функциональных, диетических и лечебно-профилактических продуктов питания. Достижение максимально возможного уровня полноценности и гарантированной безопасности – главный принцип создания функционального продукта питания.

Мы как научно-исследовательская группа и представители пищевой отрасли промышленности (сыроделие) можем внести свой вклад в разработку качественных продуктов питания для населения.

Сыр – один из наиболее предпочитаемых населением и полезных молочных продуктов. На его производство направляется значительная часть молока-сырья. В последние годы проводится множество исследований по разработке новых технологий мягких сыров, которые не сложно внедрить практически на любое сыродельное предприятие. Это позволит расширить

ассортимент продуктов и приведет к увеличению эффективности производства.

Разработка новых технологий производства мягких сыров позволит наладить выпуск лечебно-профилактических продуктов, продуктов с повышенной биологической ценностью для массового, детского и школьного питания с учетом климатических зон, экологической обстановки, особенностей трудовой деятельности и состояния здоровья [5]. По данным Росстата, болезни органов пищеварения находятся на четвертом месте. Нормальная микрофлора желудочно-кишечного тракта оказывает большое влияние на функционирование различных органов и систем за счет метаболитов, биологически активных веществ, ферментов, витаминов и других соединений, образующихся в процессе жизнедеятельности [5, 6].

Здоровая микрофлора кишечника – это самое главное для поддержания здоровья всего организма человека, поскольку именно в кишечнике формируется иммунитет, усваиваются полезные вещества. Чтобы кишечник функционировал нормально, необходимы лактобактерии, бифидобактерии и пребиотики. Бифидобактерии участвуют в переваривании белков и жиров, синтезе и всасывании витаминов, синтезе иммуноглобулинов, что является важным фактором формирования общего иммунного статуса человека, стимулируют перистальтику кишечника [1, 3]. Продуцирование лактобактериями собственных антибиотиков приводит к подавлению гнилостных условно-патогенных микроорганизмов и возбудителей острых кишечных инфекций [7].

Поэтому мы считаем, что производство комбинированных мягких сыров, обогащенных бифидобактериями, является актуальной задачей.

Применение при производстве сыра пробиотических бактерий в составе заквасочной микрофлоры позволяет создать функциональный пищевой продукт лечебно-профилактического назначения.

Для улучшения органолептических характеристик продукта и интенсификации процесса созревания в сыроделии применяют липолитические ферментные препараты, в частности, прегастральные липазы [8, 9].

Липаза – синтезируемый организмом млекопитающих водорастворимый фермент, который участвует в гидролизе липидов и фракционировании нейтральных жиров. Вместе с желчью липаза стимулирует переваривание жиров, жирных кислот, жирорастворимых витаминов А, Е, D, К.

В сыроделии липаза применяется для сокращения сроков созревания сыров, придания им определенных органолептических показателей [8]. Прегастральная липаза телят способствует созданию деликатного и мягкого пикантного аромата; липаза козлят - острого,пряного аромат, стойкого, слегка пряного; липаза овец - сильного аромата средней пряности [10–12].

Следует отметить, что липолиз происходит во всех сырах. Для интенсификации процесса распада жиров осуществляется подбор штаммов заквасочной микрофлоры с высокой липолитической активностью. Однако из-за низкой активности липолитических ферментов микроорганизмов их использование недостаточно эффективно. Добавление липазы в молочную смесь до внесения бактериальной закваски позволяет запустить процесс липолиза, обеспечить ее микрофлору субстратом, способствующим быстрому росту бактерий [12]. Бактериальная закваска при наличии готового субстрата начинает активно синтезировать ферменты, необходимые для полного цикла превращения молочного жира в процессе выработки и созревания сыров, а также формирования их структуры, вкуса и аромата [13, 14].

Важно отметить, что глубина липолиза в твердых и мягких сырах различна. В мягких сырах гидролиз жира протекает более интенсивно, в твердых – слабее [10].

Целью данной работы являлись разработка технологии и исследование мягкого сыра, обогащенного пробиотическими микроорганизмами, отличительной чертой которого является то, что продукт изготовлен из смеси молока и пахты с добавлением прегастральной липазы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве сырья для экспериментов использовалось сырое молоко и пахта. Сырье по органолептическим и физико-химическим показателям исследовалось в соответствии с нормативно-технической документацией:

– ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции»;

– ГОСТ 31449-2013 «Молоко коровье сырое. Технические условия»;

– ГОСТ Р 53513-2009 «Пахта и напитки на ее основе. Технические условия».

Определение и подсчет пробиотических микроорганизмов выполнялся в соответствии с ГОСТ 56139-2014 «Продукты пищевые специализированные и функциональные. Методы определения и подсчета микроорганизмов».

Определение активности липазы проводили по модифицированному методу Ота, Ямада, основанному на титровании щелочью жирных кислот, образующихся под действием липазы при использовании в качестве субстрата молока.

За единицу ферментативной активности липазы принимали такое количество фермента, которое освобождает 21 мкмоль жирных кислот из молока при рН 6,7 и температуре 37 °С в течение 1 ч.

Липазную активность фермента ЛА (в ед/г) определяли по формуле:

$$ЛА = \frac{A \times T \times 50}{B},$$

где ЛА – липолитическая активность, ед/г; А – разность между результатами титрования опытной и контрольной проб, см³; Т – титр щелочи; В – концентрация образца ферментного раствора, г/см³.

Определение числа водорастворимых и органически растворимых летучих жирных кислот в сыре проводили по методу В. Аристовой и А. Карышевой [15].

ОБСУЖДЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первый этап проведения исследований. Для достижения поставленной цели было выбрано два способа изготовления сыра, предназначенного для исследования:

1) получение сырного зерна термокислотным способом, охлаждение зерна с сывороткой до температуры 50 °С, внесение закваски и выдержка при данной температуре 30 мин (образец № 1), 1 ч (образец № 2) и 1,5 ч (образец № 3);

2) получение сырного зерна термокислотным способом, выдержка при температуре 85±5 °С в течение 1,5 ч, охлаждение до 50 °С и внесение закваски, предварительно активированной в небольшом количестве молока (образец № 4).

Для начала исследований было взято натуральное коровье молоко, имеющее следующие параметры: кислотность – 17°Т; массовая доля жира – 3,89%; массовая доля белка – 3,11%; сухой обезжиренный молочный остаток (СОМО) – 8,82%.

Для свертывания молока применяли закваску АСТ-10 ТМ («АлтаЛакт», Россия), имеющую в составе следующие культуры в количестве:

- *Streptococcus thermophilus* – 1·10¹⁰ КОЕ/г;
- *Bifidobacterium lactis* – 1·10⁸ КОЕ/г;
- *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* – 1·10⁸ КОЕ/г;
- *Lactobacillus acidophilus* – 1·10⁸ КОЕ/г;
- *Lactobacillus casei* – 1·10⁸ КОЕ/г.

Для получения мягкого сыра термокислотным способом молоко нагревали до 96 °С и медленно добавляли лимонную кислоту 10%-й концентрации в количестве 100 мл/л. Далее применяли режимы, указанные выше.

Органолептические свойства полученных образцов оценивали по балльной системе, результаты представлены в табл. 1.

Из приведенных данных можно заключить, что массовая доля влаги у полученных образцов не соответствует массовой доле влаги для категории мягких сыров – не менее 67% (см. табл. 2). Кроме того, при хранении в условиях холодильника (температура от 4 до 6 °С) образцы имели тенденцию к быстрой потере влаги: за семь дней хранения во всех образцах обнаружена потеря влаги более чем на 10%. Вследствие этого исследуемые продукты приобрели крошливую консистенцию. Других признаков порчи обнаружено не было.

Прежде чем перейти к дальнейшим исследованиям, необходимо было выяснить, как температура и продолжительность выдержки при 50 и 85 °С влияют на рост и развитие бифидобактерий, их содержание в готовом продукте и формирование необходимого вкуса и аромата сыра. Оптимальной для данного вида бактерий является температура от 35 до 37 °С (температура тела человека), а критической – 50 °С, соответственно, выдержка при температуре 85 °С была исключена.

Анализ на содержание в исследуемых образцах бифидобактерий проводили методом культивирования микроорганизмов на микробиологической питательной среде и дальнейшем микроскопировании. Результаты микроскопирования показали, что максимальное количество бифидобактерий присутствовало в образце № 3 (рис. 1) и составило 21·10⁶, что соответствует требованиям ГОСТ 52349–2005 «Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные», в соответствии с которым содержание пробиотической микрофлоры как функционального пищевого ингредиента в сыре должно быть не менее 10⁶ КОЕ/г. Поэтому важно, чтобы количество пробиотических микроорганизмов в разрабатываемом продукте соответствовало данному требованию. В образцах № 1 и № 2 количество бифидобактерий было несколько ниже — 9·10⁶ и 11·10⁶ соответственно. В образце № 4 обнаружено незначительное количество клеток бифидобактерий – 12·10⁴, по этой причине данный образец не может быть отнесен к функциональным пищевым продуктам.

Таблица 1. Органолептическая оценка полученных образцов

Table 1. Organoleptic evaluation of the obtained samples

| Номер образца | Органолептические показатели, балл | | | | | |
|---------------|------------------------------------|--------------|------|---------|-------------|----------|
| | Вкус и запах | Консистенция | Цвет | Рисунок | Внешний вид | Упаковка |
| 1 | 15 | 7 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 2 | 17 | 6 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 3 | 18 | 6 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 4 | 16 | 5 | 3 | 5 | 5 | 5 |

Примечание. За внешний вид и упаковку выставлен высший балл, так как исследуемые образцы не подвергались упаковке и маркировке.

Таблица 2. Массовая доля влаги образцов сыра

Table 2. Mass fraction of moisture in cheese samples

| Номер образца | Массовая доля влаги, % (после выработки сыра) |
|---------------|---|
| 1 | 65±1 |
| 2 | 63±1 |
| 3 | 62±1 |
| 4 | 52±1 |

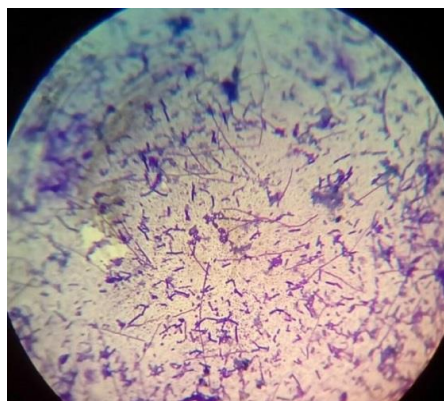


Рис. 1. Микроскопический препарат образца № 3

Fig. 1. Microscopic preparation of sample no. 3

На втором этапе исследований решался вопрос связности консистенции, снижения калорийности продукта и увеличения его витаминного и аминокислотного состава. Для дальнейшей работы был выбран образец № 3. В качестве исходного сырья была использована смесь, состоящая из пахты и молока [16, 17]. Основные показатели исходного сырья для составления смеси представлены в табл. 3.

Таблица 3. Физико-химические показатели исходного сырья

Table 3. Physical and chemical parameters of the feedstock

| Показатель | Молоко | Пахта |
|------------------------|---------|---------|
| Кислотность, °Т | 20±1 | 26±1 |
| Массовая доля жира, % | 4,0±0,5 | 0,6±0,1 |
| Массовая доля белка, % | 3,2±0,5 | 2,4±0,2 |
| Содержание СОМО, % | 8,5±0,5 | 7,8±0,5 |

Для исследования были составлены смеси молока и пахты в соотношении соответственно 50 : 50 и 70 : 30. Физико-химические показатели полученных смесей представлены в табл. 4.

Таблица 4. Физико-химические показатели смеси

Table 4. Physical and chemical parameters of the mixture

| Показатель | Смесь 50 : 50 | Смесь 70 : 30 |
|------------------------|---------------|---------------|
| Кислотность, °Т | 25±1 | 25±1 |
| Массовая доля жира, % | 2,5±0,5 | 2,6±0,1 |
| Массовая доля белка, % | 2,8±0,5 | 3,1±0,2 |
| Содержание СОМО, % | 8,2±0,5 | 8,8±0,5 |

Таким образом, было получено два образца с выдержкой при температуре 50 °С в течение одного часа: образец 1 – смесь 50 : 50, и образец 2 – смесь 70 : 30. Изменение консистенции стало заметно уже при изготовлении: было получено более мягкое творожистое зерно.

По результатам общей органолептической оценки образец 1 получил 41 балл, из них: 15 – за вкус и запах (балл снижен из-за наличия постороннего запаха – запах пахты), 6 – за консистенцию, по 5 – за цвет, рисунок, внешний вид и упаковку. Кроме того, из-за большого количества пахты существенно снизился выход продукта. Образец 2 получил 48 баллов, из них: 20 – за вкус и запах, 8 – за консистенцию, по 5 баллов – за цвет, рисунок, внешний вид и упаковку. Таким образом, введением в состав пахты удалось добиться получения более мягкой консистенции, однако получить полную связность сырной массы не удалось.

Поэтому для дальнейших исследований был выбран образец 2.

Третий этап проведения исследований. Для придания выбранному образцу сыра желаемой консистенции (нежной, однородной, слегка мажущейся) было решено добавить к продукту липазу [18, 19]. С целью выбора вида данного фермента были проведены исследования активности прегастральных липаз – телячьей, ягнчьей и козьей. Полученные данные представлены на рис. 2.

Из представленных на рис. 2 графиков очевидно, что наибольшую активность имеет телячья липаза. Кроме того, ее использование в разрабатываемом нами виде сыра не придало готовому продукту перечного пряного аромата [13, 20]. Поэтому для дальнейшего исследования была взята именно телячья липаза. Было получено (по одинаковой технологии) два образца: с применением липазы (опыт) и без (контроль), в которых определяли содержание летучих жирных кислот непосредственно после выработки и через семь суток. В табл. 5 приведены результаты измерений в ходе созревания сыра числа органически и водорастворимых летучих жирных кислот

Таблица 5. Результаты измерений числа водорастворимых летучих жирных кислот в образцах сыра

Table 5. Number of water-soluble volatile fatty acids in cheese samples

| Образец сыра | Число водорастворимых летучих жирных кислот, мг%. | |
|--------------|---|------------------|
| | после выработки | через семь суток |
| Опыт | 4,1±0,5 | 18,7±1 |
| Контроль | 3,3±0,5 | 12,5±1 |

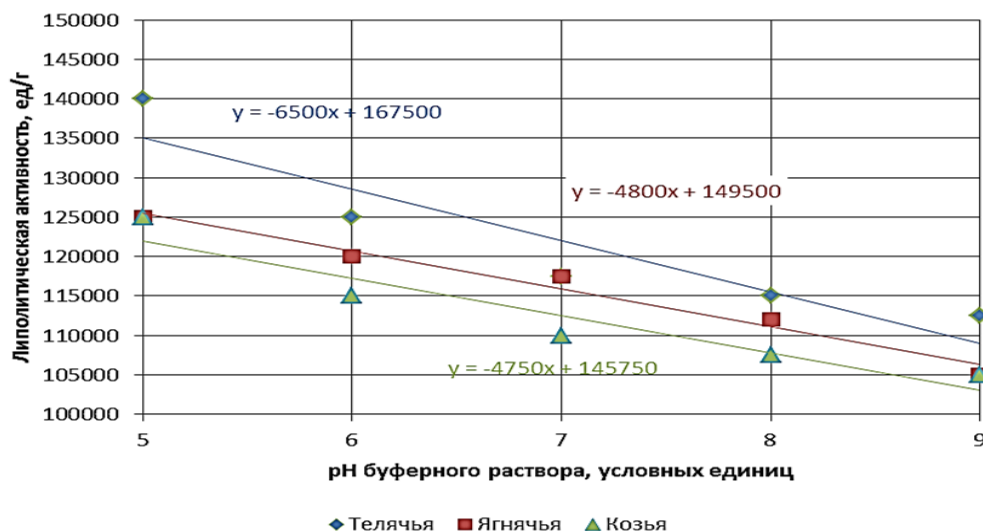


Рис. 2. Зависимость уровня липолитической активности препаратов липаз от уровня активной кислотности раствора по модифицированному методу Ота, Ямада

Fig. 2. Relationship between the lipolytic activity level of lipase preparations and the active acidity of the solution according to the modified method of Ota, Yamada

По результатам исследований видно, что в опытном образце сыра содержание водорастворимых летучих жирных кислот выше: на 20% – после выработки, на 33% – спустя семь суток.

Следует отметить, что для формирования заданных органолептических свойств у разрабатываемого продукта, а именно, приобретения им карамельного вкуса и запаха, важную роль играет протекание реакции Майяра или меланоидинообразования. Реакция происходит при взаимодействии аминокрупп белков и аминокислот с карбонильными группами углеводов. Это окислительно-восстановительный процесс с образованием различных промежуточных продуктов – меланоидинов, влияющих на вкус и цвет продукта. Скорость и глубина реакции зависит от разных факторов, в частности, от температуры и pH. В результате чего в сыре формируется лактуло-

за – изомер лактозы, или молочного сахара. Лактулоза в настоящее время является признанным бифидус-фактором, то есть стимулирует рост бифидобактерий – основной микрофлоры кишечника, благодаря чему широко используется во многих странах мира как профилактическое и терапевтическое средство при ряде заболеваний, особенно в случае формирования дисбиотических явлений [6, 7]. Результаты органолептической оценки опытного и контрольного сыров представлены в табл. 6.

Как видно из табл. 6, опытный образец сыра получил высшие баллы. Мягкий сыр, разработанный нами из смеси молока и пахты, имеет карамельный сливочный вкус. Такой вкус продукт приобрел благодаря мальтолу, образующемуся в результате реакции Майяра. Аромат у сыра приятный сырный с привкусом топления.

Таблица 6. Органолептическая оценка образцов сыра

Table 6. Organoleptic evaluation of cheese samples

| Образец сыра | Органолептические показатели, балл | | | | |
|--------------|------------------------------------|--------------|------|---------|-------------|
| | Вкус и запах | Консистенция | Цвет | Рисунок | Внешний вид |
| Опыт | 20 | 10 | 5 | 5 | 5 |
| Контроль | 18 | 8 | 5 | 5 | 5 |

Примечание. За внешний вид и упаковку выставлен высший балл, так как исследуемые образцы не подвергались упаковке и маркировке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученный мягкий сыр, разработанный согласно рецептуре с использованием различных вносимых компонентов, по своим органолептическим, физико-химическим и микробиологическим характеристикам имеет уникальные показатели. Благодаря применению

липазы удалось получить нежную, мягкую консистенцию, позволяющую легко намазывать продукт. Сыр можно использовать в качестве добавки в различные блюда и закуски. По содержанию пробиотических культур микроорганизмов разработанный продукт можно отнести к функциональным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бегунова А.В., Рожкова И.В., Зверева Е.А., Глазунова О.А., Федорова Т.В. Молочнокислые и пропионовокислые бактерии: формирование сообщества для получения функциональных продуктов с бифидогенными и гипотензивными свойствами // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 6. С. 566–577. <http://doi.org/10.1134/S0555109919060047>
2. Кожевникова Е.Н., Усенко Д.В., Николаева С.В., Елезова Л.И. Продукты с пробиотиками – важное составляющее функционального питания // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2012. Т. 91. № 4. С. 72–78.
3. Кайбышева В.О., Никонов Е.Л. Пробиотики с позиции доказательной медицины // Доказательная гастроэнтерология. 2019. Т. 8. № 3. С. 45–54. <http://doi.org/10.17116/dokgastro2019803145>
4. Усенко Д.В., Горелев А.В., Логорелова О.А. Новые горизонты применения пробиотиков // Инфекционные болезни. 2006. Т. 4. № 4. С. 57–61.
5. Стурова Ю.Г., Кашина Е.Д. Применение пробиотической закваски в биотехнологии мягкого сыра // Молочная промышленность. 2020. № 10. С. 49–51. <http://doi.org/10.31515/1019-8946-2020-10-49-51>
6. Шиповская Е.А., Евелева В.В., Черпалова Т.М. Исследование биосинтетической активности молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* при сбраживании лактозы молочной сыворотки // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. № 4. С. 635–642. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-635-642>
7. Функ И.А., Иркитова А.Н. Биотехнологический потенциал бифидобактерий // Acta Biologica Sibirica. 2016. Т. 2. № 4. С. 67–79.
8. Белов А.Н., Кригер А.В., Коваль А.Д., Миклишанский В.А. Формирование органолептических показателей сыров и управление процессом созревания // Сыроделие и маслоделие. 2018. № 4. С. 36–38.
9. Стурова Ю.Г., Гришкова А.В., Мелешкина Л.Е. Влияние прегастральных липаз на качество сыра и содержание в нем жирных кислот // Сыроделие и маслоделие. 2020. № 1. С. 16–19. <http://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-1-16-19>
10. Кригер А.В., Белов А.Н., Коваль А.Д. Интенсификация процесса созревания сыров и улучшение их качества // Сыроделие и маслоделие. 2019. № 4. С. 24–26.
11. Коваль А.Д., Белов А.Н., Гришкова А.В., Миронова А.В., Пушепьев В.А. Разработка новых технологий: 2. Роль липолитических ферментов в созревании твердого сыра с высокой температурой второго нагревания // Сыроделие и маслоделие. 2020. № 5. С. 6–8. <http://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-5-6-8>
12. Пат. № 2346450, Российская Федерация. Способ производства сыра / А.Н. Белов, Е.А. Авданина, В.В. Ельчанинов, А.Д. Коваль; патентообладатель ГНУ СибНИИС СО РАСХН; заявл. 13.06.2007; опубл. 20.02.2009. Бюл. № 5.
13. Тырсин Ю.А., Шеламова С.А. Механизмы гидролиза, синтеза и переэтерификации в пищевой биотехнологии: монография. Воронеж: Научная книга, 2012. 124 с.
14. Jaeger K., Eggert T. Lipases for biotechnology // Current Opinion in Biotechnology. 2002. Vol. 13. Issue 4. P. 390–397. [http://doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00341-5](http://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00341-5)
15. Инихов Г.С., Брио Н.П. Методы анализа молока и молочных продуктов. Москва: Пищевая промышленность, 1971. 423 с.
16. Вышемирский Ф.А., Ожгихина Н.Н. Пахта: минимум калорий – максимум биологической ценности // Молочная промышленность. 2011. № 9. С. 54–56.
17. Степанов К.М., Дармаева Г.Г., Ханхалдаева С.Г.-Д. Васильев С.С. Безотходная переработка молочного сырья // Молочная промышленность. 2020. № 2. С. 43–45. <http://doi.org/10.31515/1019-8946-2020-02-43-44>
18. Щёктова А.В., Хамагаева И.С., Цыренов В.Ж., Дарбакова Н.В., Хазагаева С.Н. Исследование процессов биотехнологической обработки коллагенсодержащего сырья для создания функциональных продуктов питания // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. № 2. С. 250–259. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-250-259>
19. Борисова А.В., Будникова Ю.В., Поликарпова К.В. Подбор ферментной системы для получения ферментно-модифицированной сырной пасты // Вестник КрасГАУ. 2018. № 6 (141). С. 167–171.
20. Самойлова Ю.В., Сорокина К.Н., Пилигев А.В., Пармон В.Н. Применение бактериальных термостабильных липолитических ферментов в современных биотехнологических процессах обзор // Катализ в промышленности. 2018. № 6. С. 61–73. <http://doi.org/10.18412/1816-0387-2018-6-61-73>

REFERENCES

1. Begunova AV, Rozhkova IV, Zvereva EA, Glazunova OA, Fedorova TV. Lactic and propionic acid bacteria for creating combined starters and obtaining functional dairy fermented products with bifidogenic and hypotensive properties. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019;55(6):566–577. (In Russian) <http://doi.org/10.1134/S0555109919060047>
2. Kozhevnikova EN, Usenko DV, Nikovleva SV, Elezova LI. Products with probiotics – an important component of functional nutrition. *Pediatriia. Zhurnal im. G.N. Speranskogo*. 2012;91(4):72–78. (In Russian)
3. Kaibysheva VO, Nikonov EL. Probiotics from

the standpoint of evidence-based medicine. *Dokazatel'naya gastroenterologiya = Russian Journal of Evidence-based gastroenterology*. 2019;8(3):45–54. (In Russian) <http://doi.org/10.17116/dokgastro2019.803145>

4. Usenko DV, Gorelov AV, Pogorelova OA. New horizons for using probiotics. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*. 2006;4(4):57–61. (In Russian)

5. Sturova YuG, Kashina ED. The use of probiotic starter culture in the developed biotechnology of soft cheese. *Molochnaya promyshlennost' = Dairy Industry*. 2020;10:49–51. (In Russian) <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2020-10-49-51>

6. Shipovskaya EA, Eveleva VV, Cherpalova TM. Biosynthetic activity study of *Lactobacillus acidophilus* lactic acid bacteria in the lactose fermentation of whey. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(4):635–642. (In English) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-4-635-642>

7. Funk IA, Irkitova AN. Biotechnological potential of bifidobacteria. *Acta Biologica Sibirica*. 2016;2(4):67–79. (In Russian)

8. Belov AN, Krieger AV, Koval' AD, Miklishansky VA. Formation the organoleptic properties of cheeses and control of cheese ripening process. *Syrodelie i maslodolie*. 2018;4:36–38. (In Russian)

9. Sturova YuG, Grishkova AV, Meleshkina LE. Effect of pregastric lipases on the quality of cheese and the content of fatty acids in the product. *Syrodelie i maslodolie*. 2020;1:16–19. (In Russian) <http://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-1-16-19>

10. Kriger AV, Belov AN, Koval' AD. Intensification of the cheese ripening process and improvement of cheese quality. *Syrodelie i maslodolie*. 2019;4:24–26. (In Russian)

11. Koval' AD, Belov AN, Grishkova AV., Mironova AV, Pushkarev VA. Development of new technologies: 2. The role of lipolytic enzymes in the maturation of hard cheese with a high second heating temperature. *Syrodelie i maslodolie*. 2020;5:6-8. (In Russian)

<http://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-5-6-8>

12. Belov AN, Avdonina EA, Yelchaninov VV, Koval AD. Cheese preparation method. Patent RF, no. 2346450; 2007. (In Russian)

13. Tyrsin YuA, Shelamova SA. *Mechanisms of hydrolysis, synthesis and transesterification in food biotechnology*. Voronezh: Nauchnaya kniga; 2012. 124 p. (In Russian)

14. Jaeger K, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002;13(4):390–397. [http://doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00341-5](http://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00341-5)

15. Inikhov GS, Brio NP. *Methods of analysis of milk and dairy products*. Moscow: Pishchevaya promyshlennost'. 1971. 423 p. (In Russian)

16. Vyshemirsky FA, Ozhgikhina NN. Buttermilk: minimum of calories – maximum of biological value. *Molochnaya promyshlennost' = Dairy Industry*. 2011;9:54–56. (In Russian)

17. Stepanov KM, Darmaeva GG, Hanhaldaeva SG-D, Vasiliev SS. Wasteless processing of the milk raw materials. *Molochnaya promyshlennost' = Dairy Industry*. 2020;2:43–45. (In Russian) <http://doi.org/10.31515/1019-8946-2020-02-43-44>

18. Shchekotova AV, Khamagaeva IS, Tsyrenov VZ, Darbakova NV, Khazagaeva SN. Biotechnological processing procedures of collagen-containing raw materials for creation of functional foods. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(2):250–259. (In English) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-2-250-259>

19. Borisova AV, Budnikova YuV, Polikarpova KV. The selection of enzyme system for the production of enzyme-modified cheese paste. *Vestnik KrasGAU = The Bulletin of KrasGAU*. 2018;6:167–171. (In Russian)

20. Samoilova YuV, Sorokina KN, Piligaev AV, Parmon VN. Application of thermostable lipolytic bacterial enzymes for modern biotechnological processes: review. *Kataliz v promyshlennosti = Catalysis in Industry*. 2018;6:61-73. (In Russian) <http://doi.org/10.18412/1816-0387-2018-6-61-73>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Стурова Юлия Геннадьевна,

к.т.н., доцент кафедры технологии продуктов питания, Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, 656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, 46, Российская Федерация, ✉ e-mail: y_sturova@mail.ru

Гришкова Анастасия Викторовна,

к.т.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории биохимии молока и молочных продуктов, Сибирский научно-исследовательский

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yuliya G. Sturova,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor, Departments of Food Technology, Altai State Technical University, 46, Lenin Ave, Barnaul, 656038, Russian Federation, ✉ e-mail: y_sturova@mail.ru

Anastasiya V. Grishkova,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor, Senior Researcher, Laboratory of Milk Biochemistry and Dairy Products,

институт сыроделия,
656016, г. Барнаул, ул. Советской Армии, 66,
Российская Федерация;
доцент кафедры биологии, гистологии,
эмбриологии и цитологии,
Алтайский государственный медицинский
университет,
656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, 40,
Российская Федерация,
e-mail: anastasiya-kriger@yandex.ru

Коньшин Вадим Владимирович,
д.х.н., доцент, заведующий кафедрой
химической технологии,
Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова,
656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, 46,
Российская Федерация,
e-mail: vadandral@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 25.03.2021.
Одобрена после рецензирования 22.05.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.*

Siberian Research Institute of Cheese Making,
66, Sovetskoi Armii St., Barnaul, 656016,
Russian Federation;
Associate Professor,
Department of Biology, Histology, Embryology
and Cytology,
Altai State Medical University,
40, Lenin Ave, Barnaul, 656038,
Russian Federation,
e-mail: anastasiya-kriger@yandex.ru

Vadim V. Konshin,
Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Head of the Department of Chemical Technology,
Altai State Technical University,
46, Lenin Ave, Barnaul, 656038,
Russian Federation,
e-mail: vadandral@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

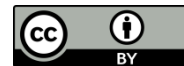
*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 25.03.2021.
Approved after reviewing 22.05.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 635.24 : 542.06

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-299-309>



Состав неорганических компонентов стеблей топинамбура

© А.В. Ковехова^{***}, О.Д. Арефьева^{***},
Н.А. Диденко^{**}, Л.А. Земнухова^{**}

*Дальневосточный федеральный университет,

г. Владивосток, Российская Федерация

**Институт химии ДВО РАН,

г. Владивосток, Российская Федерация

Резюме: Приведены результаты исследования неорганических компонентов в экстрактах стеблей топинамбура, полученных при различных значениях pH, и образцах золы. Установлено, что природа экстрагента оказывает значительное влияние на выход экстрактивных веществ из измельченных стеблей: наибольший выход (45%) достигается действием раствора гидроксида натрия, минимальный (31%) – дистиллированной воды. Как показали данные атомно-абсорбционного анализа, основными ионами в экстрактах, полученных в разных средах, являются ионы калия, кальция, натрия, магния и железа. Массовая доля золы после обработки стеблей растворами при разных значениях pH изменяется от 0,4 до 2,3%. Наименьшим выходом золы характеризуется образец стеблей после экстракции кислотой. По данным энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии во всех образцах золы содержатся преимущественно соединения K, Ca, Si и P. Наиболее высокое содержание кремния в золе стеблей наблюдается после кислотного гидролиза, что позволяет использовать ее в качестве кремнийсодержащего материала. Также были исследованы зольные компоненты сердцевин и внешней части стебля в сравнении с исходным образцом. По характеру термического разложения исходный образец и внешняя оболочка сходны между собой и отличаются от сердцевин. Зольность исходного образца составляет 4,3%, при этом зольность сердцевин стебля выше, чем внешней оболочки ~ в 2 раза (7 и 3,8% соответственно). Результаты ИК-спектроскопии показали, что характер расщепления полос в ИК-спектрах образцов золы зависит от части стебля и предварительной обработки сырья при разных значениях pH. В золе исходного образца, сердцевин, внешней оболочки, а также в золе остатков после водного и щелочного гидролиз стебля присутствуют полосы поглощения карбонатных групп. В ИК-спектрах золы стебля после кислотной обработки наблюдаются полосы поглощения, характерные для аморфного диоксида кремния. По данным рентгенофазового анализа изученные образцы золы находятся в аморфно-кристаллическом и кристаллическом состоянии, проведена идентификация фаз.

Ключевые слова: стебли топинамбура, зола, экстрактивные вещества, неорганические компоненты

Для цитирования: Ковехова А.В., Арефьева О.Д., Диденко Н.А., Земнухова Л.А. Состав неорганических компонентов стеблей топинамбура. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 2. С. 299–309. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-299-309>

Composition of inorganic components in *Helianthus tuberosus* stems

Anna V. Kovekhova^{***}, Olga D. Arefieva^{***},
Nina A. Didenko^{**}, Liudmila A. Zemnukhova^{**}

*Far Eastern Federal University,

Vladivostok, Russian Federation

**Institute of Chemistry Far-Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,

Vladivostok, Russian Federation

Abstract: This article studies inorganic components in *Helianthus tuberosus* stems. Ash samples and extracts obtained at different pH values were examined. It is established that the extractant's nature has a significant effect on the yield of extractive substances from the ground stems: the greatest (45%) and the minimum (31%) yield was achieved by sodium hydroxide and distilled water, respectively. According to atomic

absorption spectrometry, the main ions in the extracts obtained in different media are those of potassium, calcium, sodium, magnesium and iron. Following treatment of stems with solutions having different pH values, the mass fraction of ash varied from 0.4 to 2.3%. The smallest ash yield was observed for a stem sample after acid extraction. According to energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry, all ash samples contained predominantly K, Ca, Si and P compounds. Acid hydrolysis produced the highest level of Si in samples, which allows this ash to be used as a silicon-containing material. The ash components of the core and outer part of the stem were compared with the initial sample. According to the nature of thermal decomposition, the initial sample and the outer shell were similar between themselves, though differing from the core. The ash content of the initial sample was 4.3%, with the ash content of the stem core being ~2 times higher than that of the outer shell (7 and 3.8%, respectively). The results of IR spectroscopy showed that splitting of bands in the IR spectra of ash samples depend on the part of the stem and the pre-treatment of raw materials at different pH values. The ash of the initial sample, core and outer shell, as well as the ash of the residues after the aqueous and alkaline hydrolysis of the stem, showed the absorption bands of carbonate groups. The IR spectra of the stem ash after acid extraction contained absorption bands characteristic of amorphous silicon dioxide. According to the conducted X-ray analysis, the studied ash samples were in an amorphous-crystal and crystalline state. The identification of phases was carried out.

Keywords: *Helianthus tuberosus* stems, ash, extractive substances, inorganic components

For citation: Kovekhova AV, Arefieva OD, Didenko NA, Zemnukhova LA. Composition of inorganic components in *Helianthus tuberosus* stems. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):299–309. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-299-309>

ВВЕДЕНИЕ

Топинамбур (*Helianthus tuberosus* L.), или подсолнечник клубненосный – это вид однолетних травянистых клубненосных растений с высокой урожайностью, которую составляют зеленая масса (около 40 т/га) и клубни (около 50 т/га). Все возрастающий интерес диетологов и фармацевтов к этой сельскохозяйственной культуре связан в первую очередь с тем, что в ней, как и во многих других растениях (например, цикорий, лук, чеснок, спаржа), в большом количестве содержится инулин – органическое вещество из группы полисахаридов. Главная ценность инулина, находящегося в основном в клубнях растений, – в его пребиотических свойствах.

Инулин – вещество природного происхождения, не имеющее аналогов искусственного производства. Он легко усваивается организмом человека, при этом укрепляет иммунитет, улучшает работу пищеварительной системы, способствует снижению уровня холестерина в крови и снижает риск развития онкологических заболеваний. В связи с этим инулин используют для обогащения пищевых продуктов (молочных, кондитерских и хлебобулочных изделий и др.) пищевыми волокнами, а также в качестве сахарозаменителя, поскольку он имеет природный сладкий вкус [1].

Вегетативная часть растения, в том числе стебли, также представляет интерес как возобновляемое сырье разного назначения – для производства сорбентов, кормов, органических веществ, композитных материалов и топливных брикетов. Стебель растения можно разделить на внутреннюю часть – сердцевину белого цвета (14,4% по массе), и наружную – одревесневшую часть желтовато-коричневого цвета (85,6% по массе). Наружная часть стебля топинамбура бо-

лее твердая, так как в ней содержится больше полисахаридов (60,6%), чем в сердцевине (42,4%) [2, 3].

Стебли топинамбура имеют разнообразные области применения. Они служат кормом сельскохозяйственным животным как в виде зеленой подкормки, так и в силосованном виде [4, 5]. Стебли также могут использоваться как природный, дешевый и простой в получении сорбент для очистки водных растворов от ионов тяжелых металлов (например, меди [6]) и красителей [7]. Внутренняя часть стебля, благодаря своей микропористой структуре, проявляет сорбционную активность в отношении ионов меди [8], цинка, кадмия и железа [9], а также анионных красителей, таких как кислотный красный и прямой бордо, применяемых на предприятиях текстильной промышленности [10].

Химический состав вегетативной части топинамбура зависит от времени отбора [2] и части стебля [11]. Органическая составляющая стеблей представлена в основном веществами углеводной природы, сырым протеином, клетчаткой и жирами [2, 12], что позволяет их использовать для получения полезных органических веществ после химической переработки. Например, для производства целлюлозы, глюкозо-фруктозного сиропа [2, 13], биобутанола [14] и биоэтанола [15]. Выход биоэтанола на углеводсодержащем субстрате из стеблей топинамбура выше, чем на субстратах древесного происхождения [12]. Биоэтанол, полученный из стеблей топинамбура, можно использовать в пищевой, энергетической и фармацевтической промышленности [16]. Продукты из стеблей топинамбура также находят свое применение в медицине для получения биомаркеров опухолевых клеток за счет детектирования содержания молочной кисло-

ты, накапливающейся в них [17].

Измельченные стебли топинамбура способны заменить древесину в качестве сырья для производства цементно-стружечных композитов [18]. Из стеблей топинамбура можно производить топливные брикеты и гранулы для систем децентрализованного теплоснабжения животноводческих ферм и сельских потребителей [19].

Неорганический состав стеблей топинамбура изучен лишь в отдельных работах. Показано, что в сухой зеленой массе в большом количестве содержатся калий, кальций, магний [2]. При использовании топинамбура в качестве фиторемедианта распределение металлов происходит по разным частям этого растения. В клубнях накапливается больше стронция, в стеблях - титана, марганца и ванадия, а в листьях больше железа, цинка, хрома, никеля и кобальта [20]. Но в литературе отсутствуют систематические сведения о неорганических компонентах, которые необходимы для определения направлений утилизации стеблей топинамбура. Поэтому в данной работе был изучен состав неорганических компонентов как в золе, так и в экстрактах стеблей топинамбура при различных значениях рН.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования использовали образцы стеблей топинамбура (*Helianthus tuberosus*) (ТС), отобранные в Яковлевском районе Приморского края. Стебли высушивали до воздушно-сухого состояния и измельчали до размера частиц 1–5 мм. Был исследован неорганический состав экстрактов, полученных из ТС при разных значениях рН, состав их зольных остатков и зола исходного образца.

Экстракция образцов стебля при разных значениях рН. Навеску измельченных стеблей топинамбура помещали в термостойкий стакан, добавляли дистиллированную воду, раствор соляной кислоты (0,1 моль/л) или гидроксида натрия (0,1 моль/л) в соотношении Т:Ж = 1:13. Гидролиз проводили при нагревании до 90 °С с контролером температуры ЕКТ Hei-Cop (Heidolph, Германия) в течение 1 ч при перемешивании. Твердый остаток отфильтровывали через фильтровальную бумагу «синяя лента», промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции среды и высушивали.

Окислительный обжиг образцов стебля. Окислительному обжигу подвергались следующие образцы: исходный, состоящий из сердцевины и внешней части; сердцевина; внешняя часть; остатки исходного стебля после водного, кислотного и щелочного гидролиза.

Окислительный обжиг проводили в течение 3 ч в муфельной печи при 600 °С. Перед обжигом образцы карбонизировали в фарфоровой чашке на плите при температуре 300–400 °С.

Методы исследования образцов. ИК-спектры регистрировали на спектрометре Vertex 70

(Bruker, Германия) в области 400–4000 см⁻¹ по стандартным методикам с предварительным прессованием таблеток образца с KBr.

Рентгенофазовый анализ (РФА) проводили по методу Брегг – Brentano в Cu K_α-излучении на дифрактометре Bruker D8 Advance (Германия). Идентификация фаз в экспериментальных рентгенограммах проведена с использованием программы EVA банка порошковых данных PDF.

Элементный анализ золы проводился методом энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии (РФЭС) на спектрометре EDX 800 HS (Shimadzu, Япония).

Содержание ионов металлов в экстрактах определяли атомно-абсорбционным методом на спектрофотометре AA-6601F (Shimadzu, Япония) в режиме пламенного атомно-абсорбционного анализа.

Термограммы исследуемых образцов записывали на дериватографе системы Ф. Паулик, И. Паулик и Л. Эрдей марки Q-1000 (МОН, Венгрия) на воздухе в интервале 20–700 °С со скоростью 5 град/мин. Навеска составляла 40–90 мг. В качестве эталона использовали прокаленный Al₂O₃.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование экстрактивных веществ стеблей топинамбура. Результаты исследований показали, что природа экстрагента оказывает значительное влияние на выход экстрактивных веществ из стеблей топинамбура, а также их зольных остатков после экстракции в разных средах. Установлено, что наибольший выход экстрактивных веществ (45%) достигается действием на измельченные стебли топинамбура 0,1 М раствора гидроксида натрия, а минимальный (31%) – дистиллированной воды (табл. 1).

Таблица 1. Содержание растворимых веществ в стеблях топинамбура после экстракции при разных значениях рН

Table 1. Content of soluble substances in jerusalem artichoke stems after extraction at different pH values

| Экстрагент | Выход экстрактивных веществ, % | Цвет фильтрата |
|------------------|--------------------------------|-------------------|
| H ₂ O | 31 | светло-коричневый |
| HCl, 0,1 н. | 42 | светло-желтый |
| NaOH, 0,1 н. | 45 | темно-коричневый |

Цвет фильтрата меняется от светло-желтого (кислотный гидролиз) до темно-коричневого (щелочной гидролиз). Изменение цвета и увеличение выхода экстрактивных веществ в большей степени связано с удалением лигнина из биомассы и частичным гидролизом гемицеллюлозы и полисахаридов.

Содержание ионов металлов, идентифици-

рованных в водных, кислотных и щелочных экстрактах, представлено в табл. 2. Основными ионами, присутствующими в исследуемых экстрактах, являются ионы калия, кальция, натрия, магния и железа. Наибольшее количество ионов металлов, входящих в состав ТС, экстрагируется соляной кислотой.

При сравнении содержания катионов металлов в экстрактах стеблей топинамбура и подсолнечника (близкого родственника топинамбура) следует отметить, что в экстрактах стеблей подсолнечника содержится большее количество катионов металлов, за исключением кальция (см. табл. 2).

Исследование зольных образцов стеблей топинамбура. Термическое разложение образцов стеблей топинамбура (исходный, сердцевина и внешняя оболочка) изучали в температурном интервале 20–600 °С (рис. 1). Термоокислительная деструкция (ТОД) всех образцов, сопровождающаяся экзоэффектами на кривой ДТА, происходит в несколько стадий.

В интервале температур 40–150 (170) °С на

кривых ДТА трех образцов наблюдается слабо-выраженный эндотермический эффект, объясняемый удалением связанной (адсорбированной) воды. При этом убыль массы (Δm) исходного образца и внешней оболочки составляет 4,4 и 4,9% соответственно, а Δm сердцевины – 8,8% (более гигроскопичная часть) (табл. 3).

Второй этап разложения исходного образца и внешней части стебля в интервале 150–230 °С обусловлен ТОД органических компонент, присутствующих в этих образцах в большей степени, чем в сердцевине, и перекрывается с началом термоокислительной деструкции целлюлозы.

Значительная потеря массы (40–41,5%) происходит в области температур 230–360 °С (третья стадия). Для исходного образца и внешней оболочки это связано с интенсивной ТОД целлюлозы как основного компонента указанных образцов. При нагревании сердцевины до 370 °С убыль массы выше и составляет 73,7%, что свидетельствует о большем выходе летучих веществ и указывает на меньшую стойкость органических компонент сердцевины по отношению к кислороду.

Таблица 2. Содержание ионов металлов в экстрактах из стеблей топинамбура

Table 2. Content of metal ions in extracts from jerusalem artichoke stems

| Экстрагент | Содержание ионов, мкг/л | | | | |
|----------------------|-------------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|
| | K ⁺ | Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | Na ⁺ | Fe ³⁺ |
| Стебли топинамбура | | | | | |
| H ₂ O | 900,0 | 83,0 | 19,6 | 3,9 | 0,2 |
| HCl, 0,1 М | 921,0 | 377,0 | 46,7 | 29,0 | 12,0 |
| NaOH, 0,1 М | 840,0 | 67,0 | 21,0 | 2301,0* | 0,6 |
| Стебли подсолнечника | | | | | |
| H ₂ O | 2500,0 | 46,9 | 154,0 | 26,6 | 0,2 |
| HCl, 0,1 М | 2566,0 | 315,0 | 381,0 | 63,0 | 2,5 |
| NaOH, 0,1 М | 2102,0 | 23,0 | 128,0 | 1925* | 0,2 |

*Высокое содержание ионов натрия в экстракте обусловлено составом экстрагента.

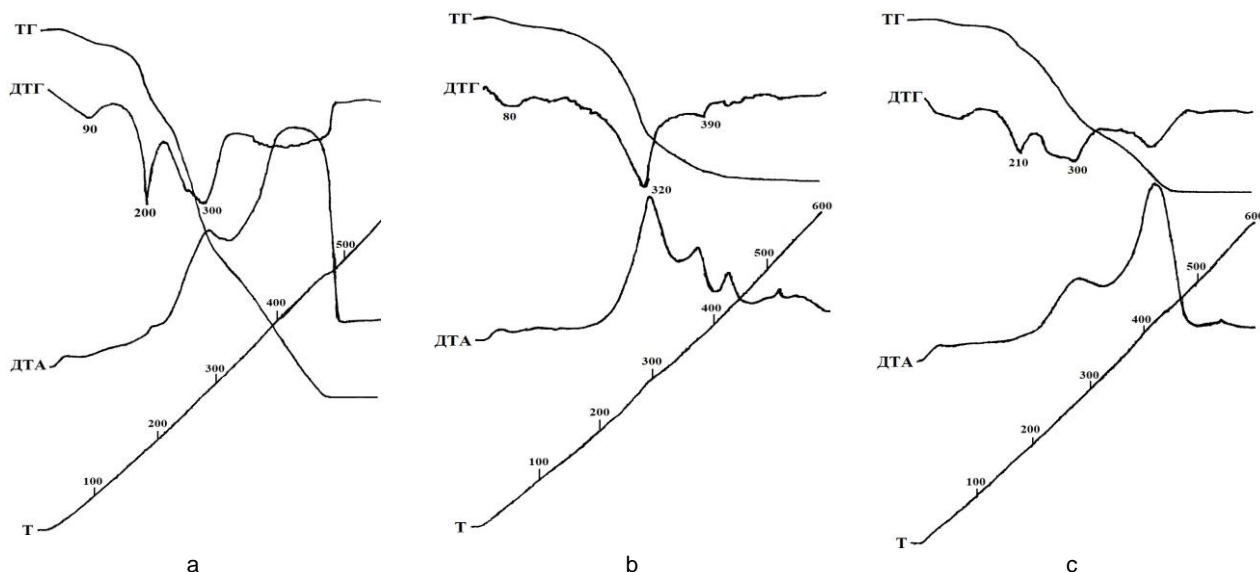


Рис. 1. Термограммы образцов стебля топинамбура: а – исходный образец; б – сердцевина; с – внешняя часть

Fig. 1. Thermograms of jerusalem artichoke stem samples a – the initial sample; b – the core; c – the outer part

Таблица 3. Убыль массы (Δm) исследованных образцов в зависимости от температуры

Table 3. Mass loss (Δm) of the studied samples as a function of temperature

| Образец | Интервал температур, °C | $\Delta m, \%$ |
|---------------|-------------------------|----------------|
| Исходный | 40–150 | 4,4 |
| | 150–230 | 17,8 |
| | 230–360 | 40,0 |
| | 360–600 | 32,3 |
| Сердцевина | 40–170 | 8,8 |
| | 170–370 | 73,7 |
| | 370–600 | 11,3 |
| Внешняя часть | 40–160 | 4,9 |
| | 160–230 | 17,0 |
| | 230–360 | 41,5 |
| | 360–600 | 31,7 |

Четвертая стадия в области 360–500 °C связана с выгоранием карбонизованого (обогащенного углеродом) остатка, которого образуется значительно меньше в случае ТОД сердцевин (11,3%).

Зольность образца ТС составляет 4,3% (табл. 4), что согласуется с данными, приведенными в работе [2]. Зольность сердцевин превышает зольность внешней оболочки в 2 раза. Зола сердцевин окрашена в белый цвет в отличие от золы исходного образца ТС и внешней оболочки, которые окрашены в серый цвет.

Таблица 4. Содержание зольных компонентов в разных частях стеблей необработанного топинамбура

Table 4. Content of ash components in different parts of the stems of untreated jerusalem artichoke

| Образец ТС | Зольность, % | Цвет золы |
|------------------|--------------|-----------|
| Исходный | 4,3 | серый |
| Сердцевина | 7,0 | белый |
| Внешняя оболочка | 3,8 | серый |

Массовая доля золы остатков стеблей исходного образца топинамбура, подвергавшихся воздействию воды, кислоты и щелочи, изменяется от 0,4 до 2,3%. Высокая зольность образца после щелочной экстракции также обусловлена используемым экстрагентом.

Наименьшим выходом золы характеризуется образец после кислотного гидролиза, в гидролизате которого наблюдается наибольшее содержание металлов (см. табл. 2).

По данным рентгенофлуоресцентного анализа, предварительная обработка стеблей водой, соляной кислотой и щелочью влияет на состав золы.

Таблица 6. Содержание химических элементов в золе стеблей топинамбура

Table 6. Content of chemical elements in the ash of jerusalem artichoke stems

| Образец золы стеблей | Содержание, % | | | | | | |
|--|------------------|------|------------------|-------------------------------|-------------------|-----|-----------------|
| | K ₂ O | CaO | SiO ₂ | P ₂ O ₅ | Na ₂ O | MgO | SO ₂ |
| Исходный | 50,1 | 22,7 | 8,5 | 10,5 | 1,6 | 3,0 | 3,45 |
| Сердцевина | 29,9 | 56,1 | 3,7 | 2,8 | 1,6 | 4,1 | 0,6 |
| Внешняя оболочка | 55,9 | 21,0 | 10,5 | 6,6 | 1,7 | 1,9 | 1,2 |
| После водного гидролиза | 39,3 | 39,1 | 6,1 | 4,4 | 3,2 | 3,8 | 1,9 |
| После кислотного гидролиза (0,1 М HCl) | 14,7 | 8,2 | 58,4 | 8,4 | 3,7 | 0,4 | 3,9 |
| После щелочного гидролиза (0,1 М NaOH) | 11,1 | 35,7 | 1,5 | 2,0 | 42,6 | 4,1 | 1,8 |

Полученные результаты свидетельствуют о том, что основными в золе являются соединения калия, кальция, кремния, фосфора, магния, натрия и серы (табл. 6). В золе внешней оболочки преобладает калий, в золе сердцевин – кальций. Содержание кремния во внешней оболочке в 2,5 раза больше, чем в сердцевине.

Таблица 5. Содержание зольных компонентов в стеблях топинамбура после экстракции при разных значениях pH

Table 5. Content of ash components in jerusalem artichoke stems after extraction at different pH values

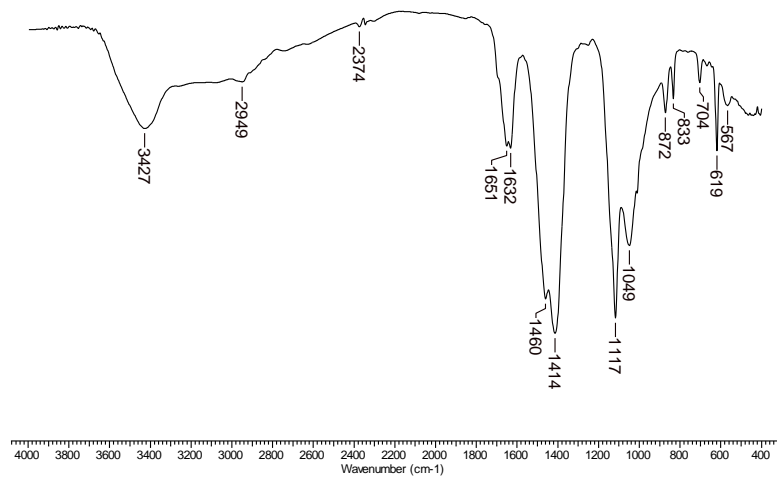
| Экстрагент | Зольность, % | Цвет золы |
|------------------|--------------|----------------|
| H ₂ O | 1,8 | светло-серый |
| HCl, 0,1 н. | 0,4 | светло-бежевый |
| NaOH, 0,1 н. | 2,3 | светло-серый |

Содержание калия в образцах золы снижается после предварительной обработки стеблей кислотой и щелочью, а кальция – только после обработки кислотой. Концентрация кремния увеличивается после кислотного гидролиза. Элементный состав образцов золы связан с разной растворимостью их соединений при различных значениях pH.

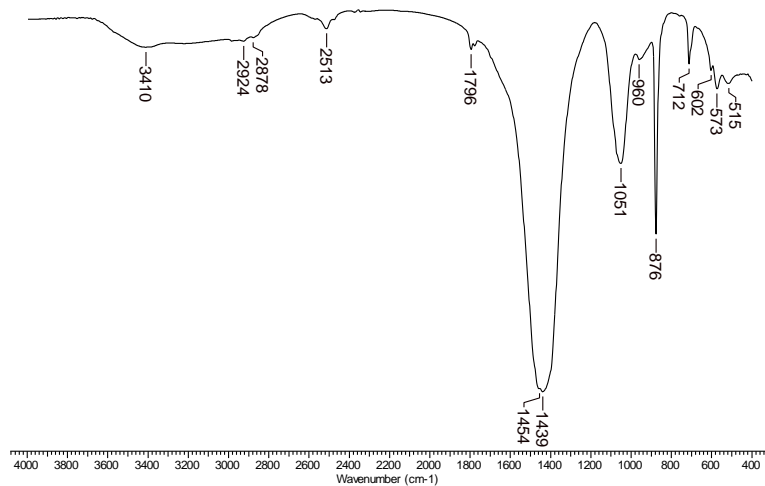
Состав основных химических элементов в золе исходного образца согласуется с данными [11], по количеству элементы в ряду располагаются в следующем порядке:



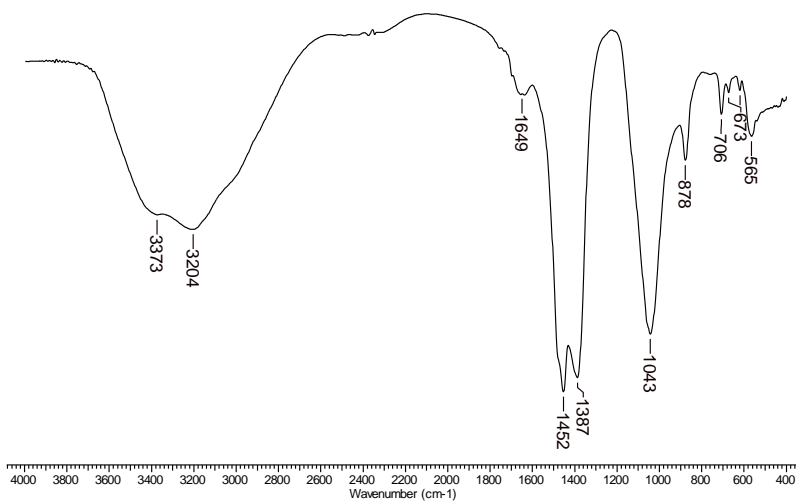
На рис. 2 представлены ИК-спектры поглощения образцов золы необработанных стеблей топинамбура: исходного, сердцевин и внешней оболочки, в которых наблюдаются полосы поглощения карбонатных групп (1460–1440 и 878–872 см⁻¹) [21] и силоксановых связей (интенсивные полосы валентных асимметричных колебаний в диапазоне 1117–1043 см⁻¹) [22]. Полосы поглощения в области 3400 и 1630–1640 см⁻¹ отвечают валентным и деформационным колебаниям адсорбированной воды и связанных ОН-групп. Согласно данным РФА, образцы золы находятся в аморфно-кристаллическом состоянии, сердцевин – в кристаллическом. (табл. 7). Основными соединениями, входящими в состав золы исходного образца и внешней оболочки, являются силикаты, а в состав сердцевин – силикаты и карбонаты, что согласуется с данными ИК-спектроскопии.



a



б



с

Рис. 2. ИК-спектры золы из стеблей топинамбура:
а – исходный образец; б – сердцевина; с – внешняя часть

Fig. 2. FTIR spectrum of ash from jerusalem artichoke stems:
а – initial sample; б – core; с – outer part

Таблица 7. Соединения, входящие в состав стеблей топинамбура, по данным РФА

Table 7. Compounds included in the stems of jerusalem artichoke according to the X-ray phase analysis data

| Образец золы стеблей | Обработка | Состояние | Идентифицированные соединения |
|--|-------------|-------------------------|--|
| Исходный | нет | аморфно-кристаллическое | KCl, Ca ₂ SiO ₄ |
| Сердцевина | нет | кристаллическое | CaCO ₃ , Ca ₂ SiO ₄ , KCl |
| Внешняя оболочка | нет | аморфно-кристаллическое | KCl, Ca ₂ SiO ₃ (OH) ₂ , Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ CO ₃ , CaMg(CO ₃) ₂ |
| После водного гидролиза | вода | аморфно-кристаллическое | Ca ₃ Si ₃ O ₈ (OH) ₂ , Ca ₂ SiO ₄ /2CaO·SiO ₂ |
| После кислотного гидролиза (0,1 М HCl) | HCl, 0,1 М | аморфно-кристаллическое | CaSiO ₃ , KCl, K ₄ CaSi ₃ O ₉ |
| После щелочного гидролиза (0,1 М NaOH) | NaOH, 0,1 М | кристаллическое | CaCO ₃ , KCl, K ₄ CaSi ₃ O ₉ |

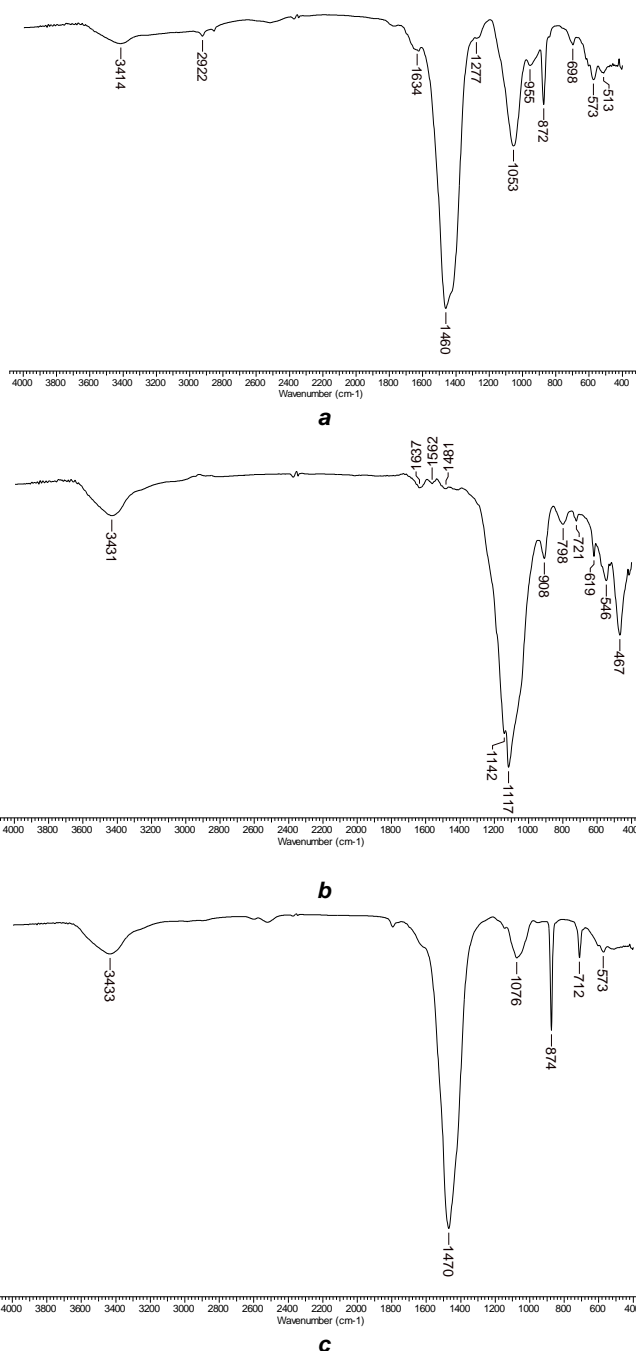


Рис. 3. ИК-спектры золы из стеблей топинамбура после обработки при разных значениях pH: а – водный гидролиз; б – кислотный гидролиз; с – щелочной гидролиз

Fig. 3. FTIR spectrum of ash from jerusalem artichoke stems after treatment at different pH values: а – water hydrolysis; б – acid hydrolysis; с – alkaline hydrolysis

Образцы золы, полученные после обработки ТС экстрагентами, находятся в аморфно-кристаллическом и кристаллическом состоянии (см. табл. 7). Идентификация линий показала, что основными соединениями, входящими в состав кристаллической фазы образцов золы, полученных после обработки стеблей топинамбура водой и кислотой, являются силикаты, а после обработки щелочью – карбонаты, что коррелирует с данными ИК-спектроскопии (рис. 3).

Полосы поглощения в области $1470\text{--}1460\text{ см}^{-1}$ и $874\text{--}872\text{ см}^{-1}$ отвечают карбонатным группам [21]. В ИК-спектре образца золы после водной экстракции видна также полоса поглощения связей силикатов Si-O-Me (1053 см^{-1}). В спектре образца после кислотной обработки стеблей (рис. 3, б) наблюдаются полосы поглощения деформационных (467 см^{-1}) и валентных (симметричных и асимметричных) колебаний (798 см^{-1} и 1117 см^{-1}) силоксановых связей Si-O-Si, а полоса при 908 см^{-1} указывает на связь Si-OH в соответствии с [22]. Вид этого спектра позволяет предположить, что аморфная фаза данного образца состоит в основном из диоксида кремния, что подтверждается и химическим анализом (см. табл. 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследован состав неорганических компонентов стеблей топинамбура. Показано, что выход экстрактивных веществ из стеблей топинамбура зависит от природы экстрагента. Наибольший выход экстрактивных веществ наблюдается при обработке сырья 0,1 М гидроксидом натрия (45%), а минимальный – водой (31%). Основными экстрагируемыми ионами являются K^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} . По характеру термического разложения исходный образец и внешняя оболочка стебля близки между собой в отличие от сердцевины. Показано, что содержание минеральных веществ в сердцевине больше, чем во внешней части, где они представлены, в основном, соединениями калия, кальция, кремния и фосфора. В результате анализа ИК-спектров установлено, что в состав золы входят карбонаты и соединения кремния. Экстракция стеблей топинамбура при разных значениях pH показала, что интерес может представлять зола после кислотной обработки стеблей как источник аморфного диоксида кремния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Перковец М.В. Инулин и олигофруктоза – больше, чем просто пищевые волокна и пребиотики // Молочная промышленность. 2007. N 9. С. 55–56.
2. Рязанова Т.В., Чупрова Н.А., Дорофеева Л.А., Богданов А.В., Шалина Ж.В. Химический состав вегетативной части топинамбура и ее использование // Лесной журнал. 1997. N 4. С. 71–75.
3. Аникиенко Т.И. Химический и микроэлементный состав клубней и зеленой массы топинамбура // Вестник КрасГАУ. 2008. N 2. С. 76–80.
4. Старовойтов В.И., Старовойтова О.А., Мамохина А.А., Звягинцев П.С. Результаты и проблемы промышленного освоения производства и переработки топинамбура // Вестник Хакасского государственного университета им. Н.Ф. Катанова. 2016. N 17. С. 48–52.
5. Papi N., Kafilzadeh F., Fazaeli H. Use of Jerusalem artichoke aerial parts as forage in fat-tailed sheep diet // Small Ruminant Research. 2019. Vol. 174. Issue 53. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.03.001>
6. Никифорова Т.Е., Козлов В.А., Багровская Н.А., Родионова М.В. Сорбционная очистка вин // Химия растительного сырья. 2007. N 1. С. 69–73.
7. Soldatkina L.M., Zavrishko M.A. Application of agriculture waste as biosorbents for dye removal from aqueous solutions // Chemistry, Physics and Technology of Surface. 2013. Vol. 4. Issue 1. P. 99–104. <https://doi.org/10.15407/hftp04.01.099>
8. Никифорова Т.Е., Козлов В.А., Натарева С.В., Соловьева Е.А., Ефимов Н.А. Сорбция ионов меди(II) из водных растворов целлюлозо-содержащим сорбентом // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. 2012. Т. 55. N 7. С. 22–27.
9. Исмоилова М.А., Камиллов Х.Ч. Исследование сорбционных свойств стеблей топинамбура // Вестник Технологического университета Таджикистана. 2017. N 3 (30). С. 21–23.
10. Солдаткина Л.М. Получение и свойства биосорбентов на основе стеблей топинамбура // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы V Всероссийской конференции с международным участием (Барнаул, 24–26 апреля 2012 г.). Барнаул: Изд-во Алтайского государственного ун-та, 2012. С. 457–458.
11. Чупарина Е.В., Гуничева Т.Н., Белоголова Г.А., Матяшенко Г.В. Применение рентгенофлуоресцентного анализа для изучения распределения химических элементов в разных частях растений (на примере топинамбура) // Аналитика и контроль. 2005. Т. 9. N 4. С. 405–409.
12. Емелина Т.Н., Рязанова Т.В., Чупрова Н.А. Получение углеводсодержащих субстратов из вегетативной части топинамбура // Химия растительного сырья. 2002. N 2. С. 117–119.
13. Дорофеева Л.А., Рязанова Т.В., Чупрова Н.А. Исследование вегетативной части топинамбура. 2. Оптимизация процесса выделения целлюлозы // Химия растительного сырья. 1998. N 2. С. 59–62.
14. Xue C., Zhang X., Wang J., Xiao M., Chen L., Bai F. The advanced strategy for enhancing bio-butanol production and high-efficient product recovery with reduced wastewater generation // Biotechnology for Biofuels. 2017. Vol. 10. Article number 148. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0836-7>

15. Song Y., Wi S.G., Kim H.M., Bae H.-J. Cellulosic bioethanol production from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) using hydrohen porexide-acetic acid (HPAC) pretreatment // *Biore-source Technology*. 2016. Vol. 214. P. 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.065>

16. Dziekonska-Kubczak U., Berlowska J., Dziugan P., Patelski P., Pielech-Przybylska K., Balcerek M. Nitric acid pretreatment of jerusalem artichoke stalks for enzymatic saccharification and bioethanol production // *Energies*. 2018. Vol. 11. Issue 8. P. 2153. <https://doi.org/10.3390/en11082153>

17. Khatun M.M., Li Y.-H., Liu C.-G., Zhao X.-Q., Bai F.-W., Mahfuza M., et al. Fed-batch saccharification and ethanol fermentation of Jerusalem artichoke stalks by an inulinase producing *Saccharomyces cerevisiae* MK01 // *RSC Advances*. 2015. Vol. 5. P. 107112–107118. <https://doi.org/10.1039/C5RA23901J>

18. Cabral M.R., Nakanishi E.Y., Marmol G., Palacios J., Godbout S., Lagace R., et al. Potential of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) stalks to

produce cement-bonded particleboards // *Industrial Crops and Products*. 2018. Vol. 122. P. 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.054>

19. Пат. № 2628608, Российская Федерация. Способ производства топливных брикетов или гранул / Я.П. Лобачевский, В.В. Михеев, Е.И. Резник, В.И. Еремченко, В.Ю. Малыхин, З.И. Рухая; патентообладатель ВНИИ механизации сельского хозяйства; заявл. 01.07.2016; опубли. 21.08.2017/.

20. Абдуллаев С.Ф., Сафаралиев Н.М., Партоев К. Исследование биологического поглощения тяжелых металлов растением-фиторемендиантом – топинамбуром // *Химическая безопасность*. 2019. Т. 3. N 1. С. 110–117. <https://doi.org/10.25514/CHS.2019.1.15009>

21. Беллами Л.Д. Инфракрасные спектры сложных молекул / пер. с англ. В.М. Акимова; под ред. Ю.А. Пентина. М.: Изд-во иностранной литературы, 1963. 590 с.

22. Плюснина И.И. Инфракрасные спектры минералов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. 175 с.

REFERENCES

1. Perkovets MV. Inulin and oligofructose mean more than simply edible fibres and prebiotics. *Молодchnaya promyshlennost'*. 2007;9:55–56. (In Russian)

2. Ryazanova TV, Chuprova NA, Dorofeeva LA, Bogdanov AV, Shalina ZhV. Chemical composition of the vegetative part of Jerusalem artichoke and its use. *Lesnoy Zhurnal = Russian Forestry Journal*. 1997;4:71–75. (In Russian)

3. Anikienko TI. Chemical and microelement composition of tubers and green mass of Jerusalem artichoke. *Vestnik KrasGAU = The Bulletin of KrasGAU*. 2008;2:76–80. (In Russian)

4. Starovoitov VI, Starovoitova OA, Manohina AA, Zvyagintsev PS. About results and problems of developing industrial production and processing of jerusalem artichoke. *Vestnik Khakasskogo gosudarstvennogo universiteta im. N.F. Katanova*. 2016;17: 48–52. (In Russian)

5. Papi N, Kafilzadeh F, Fazaeli H. Use of Jerusalem artichoke aerial parts as forage in fat-tailed sheep diet. *Small Ruminant Research*. 2019;174 (53):1–6. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.03.001>

6. Nikiforova TE, Kozlov VA, Bagrovskaya NA, Rodionova MV. Sorption cleaning of wines. *Khimija rastitel'nogo syr'ja = Chemistry of plant raw materia*. 2007;1:69–73. (In Russian)

7. Soldatkina LM, Zavrishko MA. Application of agriculture waste as biosorbents for dye removal from aqueous solutions. *Chemistry, Physics and Technology of Surface*. 2013;4(1):99–104. <https://doi.org/10.15407/hftp04.01.099>

8. Nikiforova TE, Kozlov VA, Natareev SV, Solov'eva EA, Efimov NA. Sorption of copper(II) ions from aqueous solutions with a cellulose-containing sorbent. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Seriya khimiya i khimicheskaya*

tekhnologiya = ChemChemTech. 2012;55(7):22–27. (In Russian)

9. Ismoilova MA, Kamilov KhCh. Investigation of sorption properties of topinambura steps. *Vestnik Tekhnologicheskogo universiteta Tadzjikistana*. 2017;3:21–23. (In Tajik)

10. Soldatkina LM. Preparation and properties of biosorbents based on jerusalem artichoke stems. In: *Novye dostizheniya v khimii i khimicheskoi tekhnologii rastitel'nogo syr'ya: materialy V Vserossiiskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem = Proceedings of the 5-th All-Russian Conference with International Participation "New Achievements in Chemistry and Chemical Technology of Plant Raw Materials"*. 24–26 April 2012, Barnaul. Barnaul: Izdatel'stvo Altaiskogo universiteta: 2012, p. 457–458. (In Russian)

11. Chuparina EV, Gunicheva TN, Belogolova GA, Matyashenko GV. Application of X-ray fluorescence analysis for studying chemical element distributions in different plant parts, exemplified by artichoke. *Analitika i kontrol = Analytics and Control*. 2005;994):405–409. (In Russian)

12. Emelina TN, Ryazanova TV, Chuprova NA. Preparation of carbon-containing substrates from the vegetative part of jerusalem artichoke. *Khimija rastitel'nogo syr'ja = Chemistry of plant raw material*. 2002;2:117–119. (In Russian)

13. Dorofeeva LA, Ryazanova TV, Chuprova NA. Study of the vegetative part of jerusalem artichoke. 2. Optimization of the cellulose extraction process. *Khimija rastitel'nogo syr'ja = Chemistry of plant raw materia*. 1998;2:59–62. (In Russian)

14. Xue C, Zhang X, Wang J, Xiao M, Chen L, Bai F. The advanced strategy for enhancing biobutanol production and high-efficient product recovery with reduced wastewater generation. *Biotechnology for Biofuels*. 2017;10. Article number 148. <https://>

doi.org/10.1186/s13068-017-0836-7

15. Song Y, Wi SG, Kim HM, Bae H-J. Cellulosic bioethanol production from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) using hydrothen porexide-acetic acid (HPAC) pretreatment. *Bioresource Technology*. 2016;214:30–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.065>

16. Dziekonska-Kubczak U, Berlowska J, Dziugan P, Patelski P, Pielech-Przybylska K, Balcerek M. Nitric acid pretreatment of jerusalem artichoke stalks for enzymatic saccharification and bioethanol production. *Energies*. 2018;11(8):2153. <https://doi.org/10.3390/en11082153>

17. Khatun MM, Li Y-H, Liu C-G, Zhao X-Q, Bai F-W, Mahfuz M, et al. Fed-batch saccharification and ethanol fermentation of Jerusalem artichoke stalks by an inulinase producing *Saccharomyces cerevisiae* MK01. *RSC Advances*. 2015;5:107112–107118. <https://doi.org/10.1039/C5RA23901J>

18. Cabral MR, Nakanishi EY, Marmol G, Palacios J, Godbout S, Lagace R, et al. Potential of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) stalks

to produce cement-bonded particleboards. *Industrial Crops and Products*. 2018;122:214–222. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.054>

19. Lobachevskij YP., Mikheev VV., Reznik EI., Eremchenko VI., Malykhin VYu., Rukhaya ZI. Fuel briquettes or granules roduction method. Patent RF, no. 2628608, 2016. (In Russian)

20. Abdullaev SF, Safaraliev NM, Partoev K. Study of biological absorption of heavy metals by phytoremediation plant jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Khimicheskaya bezopasnost' = Chemical Safety Science*. 2019;3(1):110–117. (In Russian) <https://doi.org/10.25514/CHS.2019.1.15009>

21. Bellamy LJ. *The Infra-red spectra of complex molecules*. London: Methuen; New York: Wiley; 1958. 425 p. (Russ. ed.: Bellami LJ. *Infrakrasnye spektry slozhnykh molekul*. Under the Editorship of Yu.A. Pentin. Moscow: Izdatel'stvo inostrannoi literatury, 1963. 590 p).

22. Plyusnina II. *Infrared spectra of minerals*. Moscow: Izdatel'stvo Moskovskogo universiteta; 1976. 175 p.(In Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ковехова Анна Васильевна,

к.х.н., доцент,
Дальневосточный федеральный университет,
690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8,
Российская Федерация;
научный сотрудник,
Институт химии ДВО РАН,
690022, г. Владивосток,
пр-т 100-летия Владивостока, 159,
Российская Федерация,
✉ e-mail: kovekhova.av@dvfu.ru

Арефьева Ольга Дмитриевна,

к.пед.н., доцент,
Дальневосточный федеральный университет,
690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8,
Российская Федерация;
научный сотрудник,
Институт химии ДВО РАН,
690022, г. Владивосток,
пр-т 100-летия Владивостока, 159,
Российская Федерация,
e-mail: arefeva.od@dvfu.ru

Диденко Нина Алексеевна,

научный сотрудник лаборатории химической радиоспектроскопии,
Институт химии ДВО РАН,
690022, г. Владивосток,
пр-т 100-летия Владивостока, 159,
Российская Федерация

Земнухова Людмила Алексеевна,

д.х.н., профессор, главный научный сотрудник
лаборатории химии редких металлов,
Институт химии ДВО РАН,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anna V. Kovekhova,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Far Eastern Federal University,
8, Sukhanov St., Vladivostok, 690950,
Russian Federation;
Researcher,
Institute of Chemistry FEB RAS,
159, Stoletiya Vladivostoka Ave.,
Vladivostok, 690022,
Russian Federation,
✉ e-mail: kovekhova.av@dvfu.ru

Olga D. Arefieva

Cand. Sci. (Pedagogy), Associate Professor
Far Eastern Federal University,
8, Sukhanov St., 690950, Vladivostok,
Russian Federation;
Researcher,
Institute of Chemistry FEB RAS,
159, Stoletiya Vladivostoka Ave.,
Vladivostok, 690022,
Russian Federation,
e-mail: arefeva.od@dvfu.ru

Nina A. Didenko,

Researcher,
Laboratory of Chemical Radio Spectroscopy,
Institute of Chemistry FEB RAS,
159, Stoletiya Vladivostoka Ave.,
Vladivostok, 690022,
Russian Federation

Liudmila A. Zemnukhova,

Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Chief Researcher,
Laboratory of Chemistry of Rare Metals,

690022, г. Владивосток,
пр-т 100-летия Владивостока, 159,
Российская Федерация,
e-mail: zemnukhova@ich.dvo.ru

Institute of Chemistry FEB RAS,
159, Stoletiya Vladivostoka Ave.,
Vladivostok, 690022,
Russian Federation,
e-mail: zemnukhova@ich.dvo.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта ин-
тересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 09.04.2021.
Одобрена после рецензирования 17.05.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.*

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

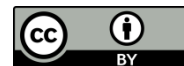
*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

*The article was submitted 09.04.2021.
Approved after reviewing 17.05.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Оригинальная статья / Original article

УДК 577.1: 543.42: 547.1

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-310-317>



Синтез и биологическая активность N⁶-маннопиранозиладенинов

© И.С. Черепанов, А.А. Камашева, Э.И. Кашапова

Удмуртский государственный университет,
г. Ижевск, Российская Федерация

Резюме: Выполнен синтез потенциально биоактивных продуктов конденсации аденина с D-маннозой и 6-дезоксид-L-маннозой (L-рамнозой) в водных и этанольных растворах. На основании данных ИК-Фурье спектроскопии и элементного анализа установлено, что моно-N⁶-гликозилированные аденины с удовлетворительными выходами выделяются из водных систем, тогда как в этанольных растворах образуются смеси N⁶, N⁹-продуктов, а также комплексы последних с ионами меди. Детальный анализ колебательных спектров N⁶-гликозиладенинов подтверждает строение углеводных фрагментов в виде пиранозных циклов, при этом часть продукта образуется в виде дезоксиаминокетоз. N-рамнозиладенин образуется с более чем вдвое большим выходом по причине более высокой устойчивости рамнозы в отношении побочных реакций. Спектры отражения модельных растворов гликозиладенинов, регистрируемые через 4 суток после приготовления, не обнаруживают полос, характерных для свободного аденина в области 1250–1110 см⁻¹, что свидетельствует о достаточной устойчивости синтезированных продуктов к гидролитическому расщеплению в условиях эксперимента. Биотестирование выделенных продуктов на семенах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) показывает увеличение содержания хлорофиллов в проростках для обоих маннозиладенинов в сравнении с контролем. Уменьшение концентрации синтезированных продуктов в растворах проращивания с 0,1 до 0,001% приводит к усилению накопления фотосинтетических пигментов, при этом для рамнозиладенина данный эффект выражен сильнее. Последнее может быть связано со структурными особенностями углеводных фрагментов, в частности, различия в степени гидроксирования гликозидных фрагментов. Механизмы трансформации и активного действия N⁶-замещенных аденинов планируется изучить в дальнейшем.

Ключевые слова: аденин, D-манноза, L-рамноза, биологическая активность, спектроскопия

Для цитирования: Черепанов И.С., Камашева А.А., Кашапова Э.И. Синтез и биологическая активность N⁶-маннопиранозиладенинов. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 2. С. 310–317. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-310-317>

Synthesis and biological activity of N⁶-mannopyranosyladenines

Igor S. Cherepanov, Anna A. Kamasheva, El'nara I. Kashapova

Udmurt State University,
Izhevsk, Russian Federation

Abstract: In this work, potentially bioactive condensation products of adenine with D-mannose and 6-deoxy-L-mannose (L-rhamnose) were synthesized in water and ethanol solutions. According to FTIR spectroscopy and elemental analysis, mono-N⁶-glycosylated adenines were isolated from water systems in satisfactory yields, while ethanol solutions contained mixtures of N⁶ and N⁹-products, as well as complexes of the latter with copper ions. A detailed analysis of the vibrational spectra of N⁶-glycosyladenines confirmed the structure of carbohydrate fragments in the form of pyranose rings, while some part of the product was obtained in the form of deoxyaminoketosis. N-rhamnosyladenine was formed with a more than double yield because of a higher stability of rhamnose with regard to side reactions. The reflection spectra of model solutions of glycosyladenines, recorded 4 days after preparation, showed no bands characteristic of free adenine in the range of 1250–1110 cm⁻¹, which indicates a sufficient resistance of the synthesized products towards hydrolytic cleavage under experimental conditions. The conducted biotesting of the isolated products on wheat seeds (*Triticum aestivum* L.) showed an increase in the content of chlorophylls in seedlings for both mannosyladenines compared to the control. A decrease in the concentration of synthesized products in germination solutions from 0.1 to 0.001% led to an increase in the accumulation of photosynthetic pigments, while this effect was more pronounced for rhamnosyladenine. The latter can be connected with the structural features of car-

bohydrate fragments, in particular, the differences in the hydroxylation degree of glucoside fragments. Future research will investigate the mechanisms of transformation and action of N⁶-substituted adenines.

Keywords: adenine, D-mannose, L-rhamnose, biological activity, spectroscopy

For citation: Cherepanov IS, Kamasheva AA, Kashapova EI. Synthesis and biological activity of N⁶-mannopyranosyladenines. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):310–317. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-310-317>

ВВЕДЕНИЕ

Цитокинины являются важными биологически активными соединениями – классическими фитогормонами, оказывающими влияние на ростовые процессы, интенсифицируя клеточное деление и адаптацию растений к внешним воздействиям [1]. Интенсивное изучение корреляций «структура–активность» цитокининов позволяет построить целостную концепцию химической природы данных гормонов. Одним из важнейших классов органических веществ с цитокининовой активностью являются производные 6-аминопурина (аденина), замещенные по атомам азота аминогруппы различными фрагментами: 2'-изопентенил, бензил, *o,p*-азидобензил [2]. Проявление биоактивности последних доказана для низких концентраций (10⁻⁶ мМ), что предполагает перспективность их применения в сверхмалых дозах и соответствующую экономичность.

Значительный интерес представляют углевод-замещенные аденины [3], что связано, вероятно, с биологической активностью, проявляемой их природными аналогами [4]. При этом гликозилированные аденины обладают достаточной в сравнении с классическими препаратами (кинетином, 6-бензиламинопурином) водорастворимостью и относительной стабильностью в растворах [5]. Вопросы синтеза указанных веществ и природа их биоактивности в научной литературе освещены в незначительной степени. Имеющиеся исследования указывают на преимущественное образование N⁶-моноголикозиладенинов в условиях прямого взаимодействия компонентов при нагревании их водных растворов [6]. Дополнительное изучение данной проблемы показывает возможность образования N⁶,N⁹-дигликозилированных продуктов в присутствии ионов металлов в качестве катализатора [7]. В этом случае, помимо участия в реакции активной первичной аминогруппы, реагирует также и активированный за счет комплексообразования N⁹-реакционный центр молекулы аденина [6]. Углеводный фрагмент, по данным авторов работ [3, 6], может входить в структуру в виде гликозидного цикла [8, 9], присутствовать в ациклической форме основания Шиффа, либо кето-форме, образующейся в результате перегруппировки Амадори [6].

К настоящему моменту установлены некоторые закономерности корреляций «структура–свойства» для N⁶-замещенных аденинов [4]. В

частности, показано, что их цитокининовая активность зависит от размера и геометрии заместителя при аминогруппе, а также его гидрофобности, при этом для непредельных заместителей транс-конфигурация кратной связи в боковой цепи усиливает биоактивность. Следует отметить, что большинство работ посвящено изучению проблем синтеза, строения и биоактивности продуктов конденсации аденина с D-рибозой и D-глюкозой [3, 6], тогда как другие углеводы не менее интересны в плане образования биологически активных производных, проявляющих свойства рострегуляторов.

В связи с вышесказанным целью настоящей работы являлось изучение синтетических продуктов конденсации аденина (Ade) с D-маннозой (Man) и 6-дезоксид-L-маннозой (L-рамнозой, Rha) на активность фотосинтетического аппарата семян пшеницы (*Triticum aestivum* L.).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез целевых конъюгатов проводили по двум методикам [6, 9].

Методика 1. В 20 мл абсолютированного этанола («Мерск», Германия) вносили по 0,05 г аденина и углевода, после чего добавляли 1 мл 3%-го этанольного раствора CuCl₂, смесь нагревали в колбе с обратным холодильником на водяной бане в течение 1 ч, поддерживая равномерное кипение. После окончания синтеза отфильтровывали твердую фазу, из фильтрата удаляли избыток растворителя и высушивали твердый продукт в эксикаторе.

Методика 2. 0,02 г аденина и 0,02 г углевода растворяли в 5 мл дистиллированной воды, полученный раствор медленно упаривали в фарфоровых чашках досуха, твердый продукт промывали последовательно холодной водой, этанолом и высушивали в эксикаторе.

ИК-Фурье спектры твердых продуктов снимали на ИК-Фурье спектрометре ФСМ-2201 (ООО «Инфраспек», Россия) в таблетках KBr (1:250) в интервале волновых чисел 4000–400 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹, полученные спектры обрабатывали в программе FSPEC 4.0.3.9. Спектры отражения модельных 1%-х растворов гликозиладенинов регистрировали с использованием приставки МНПВО-36 в интервале волновых чисел 4000–650 см⁻¹. Элементный анализ твердых продуктов проводили на анализаторе Vario MICRO cube («Elementar Analysensysteme GmbH», Германия).

Проращивание семян тест-растения (пшеница, сорт Московская 25) осуществляли в чашках Петри при температуре 25 °С, для чего на полностью увлажненную фильтровальную бумагу выкладывали по 8 семян. Эксперимент проводился в течение 4 суток, по окончании контролировали длину проростков нормально проросших семян в 0,1; 0,01 и 0,001%-х растворах N⁶-гликозилированных аденинов в сравнении с контролем (дистиллированная вода). Биоактивность определяли по накоплению фотосинтетических пигментов в процессе роста, для чего по окончании вегетационных экспериментов проростки выдерживали на свету в течение 4 ч и проводили экстракцию хлорофиллов 96%-м этанолом (пробы 50 мг, 10 мл этанола). Электронные спектры экстрактов снимали на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия) в кварцевых кюветках (*l* = 1 см) в интервале длин волн 300-800 нм с шагом 5 нм. Содержание фотосинтетических пигментов рассчитывали по формулам [10].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основными проблемами синтеза N⁶-гликозилированных аденинов является сравнительно низкая реакционная способность аминогруппы при высокой лабильности углеводов в условиях термостатирования [6]. В частности, авторами работы [9] было отмечено, что большинство углеводов нестабильно в водных растворах даже в средах, близких к нейтральным. В связи с этим в качестве гликозилирующих агентов нами была выбрана сравнительно устойчивая к трансформациям в растворах *D*-манноза [9] и, как было показано ранее, инертная по отношению к реакциям неферментативного окрашивания (образованию поздних продуктов Майяра) 6-дезоксид-*L*-

манноза (*L*-рамноза) [11].

ИК-Фурье спектр аденина (рис. 1, спектр 1) характеризуется наличием большого числа полос, отнесение которых представлено в табл. 1.

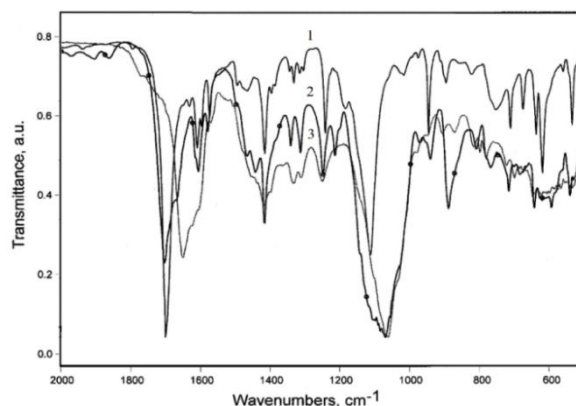


Рис. 1. ИК-Фурье спектры аденина (1) и продуктов его конденсации с *D*-маннозой в этанольном (2) и водном (3) растворах

Fig. 1. IR Fourier transform spectra of adenine (1) and its *D*-mannose condensation products, isolated from ethanol (2) and aqueous (3) solutions

На рис. 1 также представлены колебательные спектры продуктов конденсации в системе аденин – *D*-манноза (спектры 2, 3), а отнесение их основных полос дано в табл. 1.

Широкая полоса 1060 см⁻¹ может указывать на образование продукта конденсации аденина с углеводом [3]. В «аномерной» области регистрируется сигнал при 887 см⁻¹, относимый к деформационным колебаниям C₁-H-связи гликозидного фрагмента [17].

Таблица 1. Отнесение полос (см⁻¹) в ИК-Фурье спектрах аденина и продуктов его конденсации с углеводами

Table 1. Assignment of bands (cm⁻¹) in FTIR spectra of adenine and its condensation products with carbohydrates

| Ade | Ade – Man | | Ade – Rha | | Отнесение [1, 3, 11–16] |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------------|--|
| | Методика 1 | Методика 2 | Методика 1 | Методика 2 | |
| 1697 | – | 1720 | – | 1720 | <i>V</i> _{C=O} |
| 1608 | 1604, 1660 | 1600, 1649 | 1608 | 1604, 1649 | δ _{NH₂} , <i>V</i> _{C6-NH₂} |
| 1571 | 1580 | 1580 плечо | 1573 | 1580 плечо | <i>V</i> _{C=C} , <i>V</i> _{C=N} |
| 1510 | – | 1510 | 1510 | 1510 плечо | δ _{NH} |
| 1465 | 1460 | 1450 | 1455 | 1452 | δ _{C-N9-H} |
| 1413 | 1413 | 1415 | 1415 | 1417 | <i>V</i> _{гетероцикл} , δ _{HC} |
| 1310, 1330 | 1311, 1340 | 1310, 1330 | 1303, 1330 | 1309, 1329 | <i>V</i> _{N=CH} |
| 1240 | 1211, 1246 | 1247 | 1245 | 1247 | <i>V</i> _{C-N} |
| 1110 | – | – | – | – | <i>V</i> _{C-N + V} _{C-NH₂} |
| 1016 | 1066, 1030 плечо | 1060, 1030 плечо | 1124, 1072, 1035 | 1122, 1060, 1015 плечо | δ _{NC} , δ _{HC} |
| 945 | 939 | 935 плечо | 945 | 943 | <i>V</i> _{C-O-H} , δ _{C-O-C} , δ _{C-O} , N-гликозид |
| 894 | – | 887 | – | – | δ _{C-N-C} , ρ _{NH₂} |
| 821 | 812 | 800 | 810 | 800 | δ _{N-C=N} |
| 752 | 765 | 779 | 738 | – | δ _{C-H} , δ _{пиранозид} |
| 709 | 680 | 680 | 709 | 698 | γ _{N9-H} |
| 617 | 640 | – | 619 | 635 | γ _{NH₂} |
| 546 | 570 | – | 480, 550 | 544 | δ _{C-C} , δ _{C-N} |
| | | | | | ρ _{CH} |
| | | | | | δ _{N-C-C} , δ _{N-H} |
| | | | | | δ _{N-C} , δ _{C-C} , <i>V</i> _{Cu-N} |

Вторые производные спектральной области 1000–1100 cm^{-1} позволяют наблюдать несколько отдельных составляющих для обоих типов продуктов, что указывает на пиранозную форму гликозидного кольца (рис. 2).

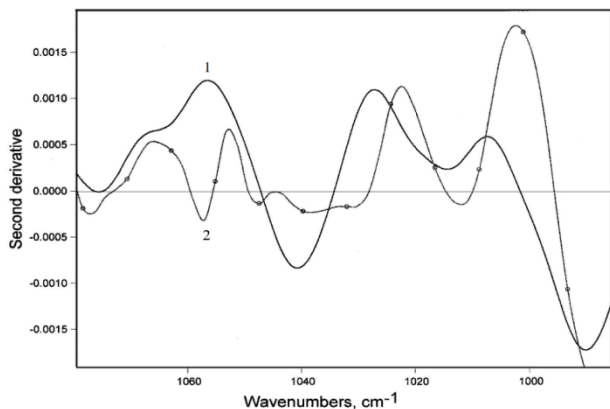


Рис. 2. Вторые производные ИК-Фурье спектров продуктов конденсации аденина с *D*-маннозой в водном (1) и этанольном (2) растворах

Fig. 2. IR Fourier transform spectra second derivative of adenine - *D*-mannose condensation products, isolated from aqueous (1) and ethanol (2) solutions

Наиболее существенные различия в спектрах продуктов, синтезированных по разным методикам, наблюдаются при сопоставлении полос колебаний N–C- и N–H-связей, участвующих в образовании продуктов конденсации. Полоса деформационных колебаний аминогруппы 1697 cm^{-1} регистрируется в области сравнительно высоких частот, что свидетельствует о присутствии частично протонированной формы аденина [12]. Названная полоса в спектре 2 незначительно сдвигается в высокочастотную область, снижая интенсивность, что, по мнению авторов публикации [13], указывает на образование связи ионов металла с аминогруппой; координация $\text{N}^9 \rightarrow \text{M}$ сдвигает полосу 1697 cm^{-1} в низкочастотную область [12]. В то же время авторы работы [1] указывают на вклад в полосу 1700 cm^{-1} валентных C=N-колебаний (возможно, $\nu_{\text{C}6-\text{NH}_2}$ [10]), что делает смещение обсуждаемого сигнала незначительным. Дополнительным подтверждением эффекта комплексообразования является смещение полос маятниковых колебаний ν_{NH_2} (821 cm^{-1}) в низкочастотную область, а также положение полос $\nu < 600 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{M-N}}$) [13, 14]. По данным, представленным в работах [14, 15], подобная ситуация имеет место при образовании комплексных соединений Cu^{2+} -аминоконъюгат, при этом дополнительно регистрируются полосы 1211 и 765 cm^{-1} , относимые к валентным колебаниям N^9-C_1 и деформационным колебаниям $\text{N}^9-\text{C}_1-\text{O}$ соответственно [15]. Последнее в совокупности с полосой 1055 cm^{-1} ($\text{N}^9-\text{C}_1-\text{H}_1$) в спектре второй производной (см. рис. 2) и отсут-

ствием сигналов при 1510 ($\delta_{\text{C-N}_9-\text{H}}$) и 894 cm^{-1} ($\nu_{\text{N}_9-\text{H}}$) подтверждает N^9 -гликозилирование аденина [3].

Продукт, выделенный из водного раствора (см. рис. 1, спектр 3), не показывает в спектре полос в области 1690–1700 cm^{-1} , интенсивно проявляются пик 1649 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=N}}$) и два плеча – 1600 и 1580 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=C}}$, δ_{NH}), характерных для N^6 -замещенных аденинов [16, 18]. В «аномерной» области регистрируется сигнал 880 cm^{-1} , относимый к деформационным колебаниям C–H-связи гликозидного фрагмента в совокупности с полосой 895 cm^{-1} ($\nu_{\text{N}_9-\text{H}}$), указывая на отсутствие гликозилирования по N^9 -атому азота, что согласуется с данными работы [6] полученными на основании масс-спектрометрического анализа. Сведения, представленные в работе [19], также подтверждают более высокую реакционную способность аминогруппы в реакциях гликозилирования. Полоса при 1720 cm^{-1} , относимая к колебаниям карбонильной группы, свидетельствует о присутствии части продукта в форме дезоксиаминокетозы (продукта перегруппировки Амадори), образование подобных структур в Ман-системах было отмечено ранее [20].

Колебательные спектры продуктов конденсации в системе аденин – *L*-рамноза представлены на рис. 3 (спектры 2, 3). Образование продуктов конденсации подтверждается наличием достаточно разрешенных полос в области 1000–1100 cm^{-1} , причем несколько интенсивных сигналов в данной области также характеризуют пиранозную форму гликозидного кольца.

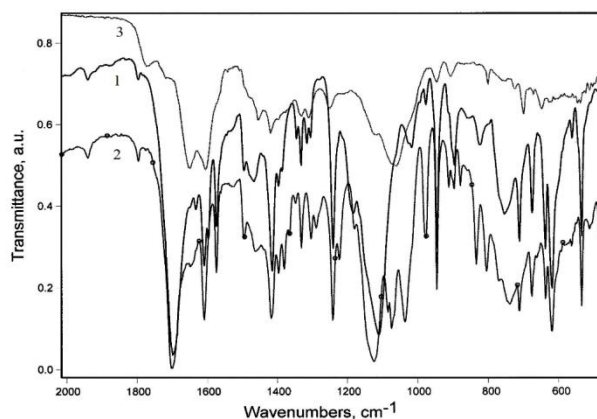


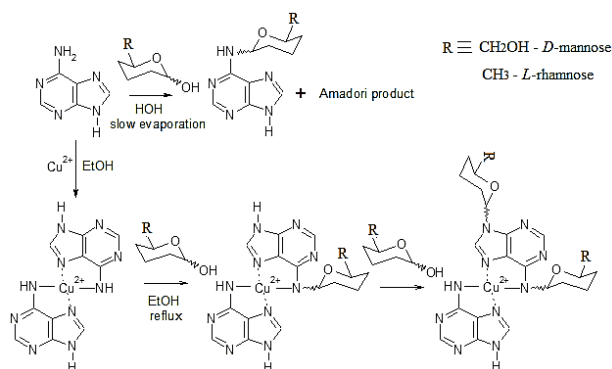
Рис. 3. ИК-Фурье спектры аденина (1) и продуктов его конденсации с *L*-рамнозой в этанольном (2) и водном (3) растворах

Fig. 3. IR Fourier transform spectra of adenine (1) and its *L*-rhamnose condensation products, isolated from ethanol (2) and aqueous (3) solutions

Анализ спектральных контуров подтверждает наличие структурных особенностей, описанных для системы аденин – *D*-манноза, с тем отличием, что в спектрах продуктов, синтезированных по обоим методикам, присутствуют полосы 1510 cm^{-1} ($\delta_{\text{C-N}_9-\text{H}}$) при отсутствии сигналов

1210 см⁻¹ (ν_{N9-C}), что указывает на отсутствие реакций по N⁹-H-фрагменту [3, 18]. Последнее в сравнении со строением продукта, полученного в системе с D-маннозой по методике 1, связано, вероятно, с меньшей реакционной способностью L-рамнозы в реакциях гликозилирования.

Таким образом, на основании проведенного анализа можно предположить, что продукты синтеза в этанольных средах представляют собой комплексные соединения в системе Cu²⁺ – аденин – углевод, тогда как из водной среды можно выделить N⁶-гликозилированные аденины, что может быть обобщено в виде схемы (в структуре углеводного цикла показан только C₁-OH-фрагмент без учета типа конформации) [6]:



Комплексные соединения Cu(II) – аминоконъюгат, согласно литературным данным, сравнительно неустойчивы в водных растворах [6] и способны разрушаться с образованием смеси исходных компонентов и конечных продуктов различного состава. Поликомпонентность в этом случае затрудняет оценку биоактивности, тогда как необходимость фракционирования усложняет методику, в связи с чем в дальнейшем для биотестирования использовали синтезированные в водной среде N⁶-гликозилированные аденины, элементный состав и оценка биоактивности которых представлены в табл. 2.

Данные, представленные в табл. 2, демонстрируют увеличение содержания хлорофиллов в сравнении с контролем, при этом снижение концентрации гликозилированного аденина приводит в обоих случаях к росту количества хлорофиллов. Классические цитокинины, в частности, 6-бензиладенин, показывают увеличение содержания фотосинтетических пигментов с ростом концентрации [21]. Более детальное изучение динамики действия природных и синте-

тических цитокининов обнаруживает сложные зависимости, при этом отмечается взаимосвязь их биоактивности с химической стабильностью и устойчивостью в отношении процессов конъюгации [22].

Спектры отражения модельных растворов гликозиладенинов (1%), регистрируемые через 4 суток после приготовления, не обнаруживают полос, характерных для свободного аденина в области 1250–1110 см⁻¹ [5], что свидетельствует о достаточной устойчивости синтезированных продуктов к гидролитическому расщеплению в условиях эксперимента (рис. 4).

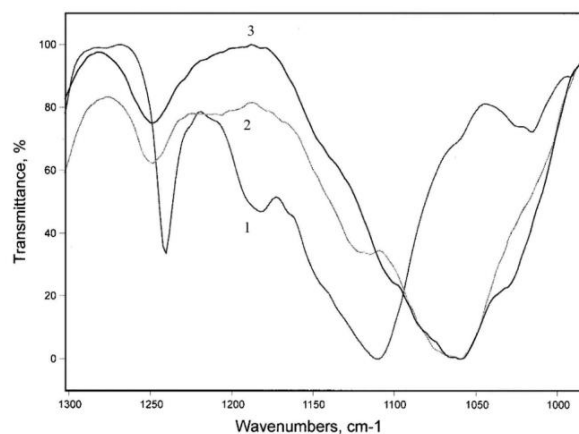


Рис. 4. Спектры отражения модельных водных растворов аденина (1) и гликозиладенинов (2 – Rha), (3 – Man)

Fig. 4. Reflectance spectra of adenine (1) and glycosyladenines (2 – Rha), (3 – Man) model aqueous solutions

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что синтезированные продукты представляют собой устойчивые в водных растворах N⁶-гликопиранозиламины аденина, активирующие фотосинтетический аппарат тест-растений *Triticum aestivum* L. Различие в степени активации накопления хлорофиллов может быть связано со структурными особенностями углеводных фрагментов гликозиладенинов, в частности, различной степени гидроксирования и большей гидрофобности остатка L-рамнозы за счет отсутствия C₆-OH-группы, что, согласно литературным данным [4], повышает биоактивность N⁶-замещенных аденинов.

Таблица 2. Характеристики состава и биоактивности синтезированных продуктов

Table 2. Composition and bioactivity of the synthesized products

| Продукт | Выход, % | Элементный состав, % | | | Содержание суммы Chl при концентрации, %, продукта в растворе проращивания | | | |
|---------|----------|----------------------|------|-------|--|-----------|-----------|-----------|
| | | C | H | N | 0 | 0,1 | 0,01 | 0,001 |
| Ade-Man | 37 | 45,21 | 5,12 | 24,31 | 0,21±0,05 | 0,22±0,02 | 0,29±0,04 | 0,36±0,02 |
| Ade-Rha | 83 | 47,22 | 5,41 | 25,32 | 0,21±0,05 | 0,28±0,02 | 0,31±0,01 | 0,58±0,07 |

ВЫВОДЫ

Выбраны оптимальные условия синтеза потенциально биоактивных продуктов конденсации аденина с D-маннозой и 6-дезоксид-маннозой (L-рамнозой). Показано, что моно-N⁶-гликозилированные аденины с удовлетворительными выходами выделяются из водных систем, тогда как в этанольных растворах образуются смеси N⁶,N⁹-продуктов, а также их комплексы с ионами меди, вводимыми в качестве катализатора. Анализ колебательных спектров N⁶-гликозиладенинов подтверждает строение углеводных фрагментов в виде пиранозных циклов, устойчивых к гидролитическому расщеплению в условиях вегетационных экспериментов. N-рамнозиладенин образуется с более чем вдвое большим выходом по причине более высокой устойчивости рамнозы в отношении побочных реакций. Биотестирование выделенных продуктов на семенах пшеницы (*Triticum Aesti-*

vum L.) показывает увеличение содержания хлорофиллов в растворах проращивания для обоих продуктов в сравнении с контролем. Уменьшение концентрации N-гликозиладенинов в растворах (с 0,1 до 0,001%) приводит к усилению накопления фотосинтетических пигментов, при этом для рамнозиладенина данный эффект выражен сильнее. Различие в степени активации накопления хлорофиллов может быть связано со структурными особенностями углеводных фрагментов гликозиладенинов, в частности, различной степени гидроксигликозилирования и большей гидрофобности остатка L-рамнозы за счет отсутствия C₆-ОН-группы, что, согласно литературным данным, повышает биоактивность N⁶-замещенных аденинов. Направление дальнейших исследований планируется связать с установлением механизмов трансформации и активного действия синтезированных препаратов на стадии роста и развития растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mhatre V., Joshi V. Synthesis of new substituted 6-ureidopurines and 6-ureido-9-(2,3,5-triacetyl ribofuranosyl)purines having cytokinin (plant growth promoting) activity // Indonesian Journal of Chemistry. 2002. Vol. 41B. Issue 12. P. 2667–2675. <https://doi.org/10.1002/chin.200313195>
2. Mornet R., Theiler J.B., Leonard N.J., Schmitz R.Y., Moore F.H., Skoog F. Active cytokinins. Photoaffinity labeling agents to detect binding // Plant Physiology. 1979. Vol. 64. Issue 4. P. 600–610. <https://doi.org/10.1104/pp.64.4.600>
3. Mathlouthi M., Seuvre A.-M., Koenig J.L. FTIR and laser-Raman spectra of adenine and adenosine // Carbohydrate Research. 1984. Vol. 131. Issue 1. P. 1–15. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85398-7](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85398-7)
4. Maruyama T., Tanaka A., Oda M., Suzuki T., Oritani T. Synthesis and biological activity of new water-soluble cytokinins // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 1993. Vol. 57. Issue 5. P. 803–807. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.803>
5. Hart D.S., Keightley A., Sappington D., Nguyen P.T.M., Chritton C., Seckinger G.R., et al. Stability of adenine-based cytokinins in aqueous solutions // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 2016. Vol. 52. P. 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9734-5>
6. Nashalian O., Yaylayan V. Reactivity of nitrogen atoms in adenine and (Ade)₂Cu complexes towards ribose and 2-furanmethanol: formation of adenosine and kinetin // Food Chemistry. 2017. Vol. 215. P. 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.012>
7. Nam I., Nam H.G., Zare R.N. Abiotic synthesis of purine and pyrimidine ribonucleosides in aqueous microdroplets // PNAS. 2018. Vol. 115. Issue 1. P. 36–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718559115>
8. Knerr T., Osch S., Severin T. Reaction of guanosine, 2'-deoxyguanosine and guanosine-5'-monophosphate with glucose // Carbohydrate Research. 1994. Vol. 256. Issue 1. P. 177–183. [http://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)84236-1](http://doi.org/10.1016/0008-6215(94)84236-1)
9. Larralde R., Robertson M.P., Miller S.L. Rates of decomposition of ribose and other sugars: Implication of chemical evolution // PNAS. 1995. Vol. 92. Issue 18. P. 8158–8160. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8158>
10. Sharma S., Uttam R., Singh P., Uttam K. Detection of vibrational spectroscopic biomarkers of the effect of gold nanoparticles of wheat seedlings using attenuated total reflectance Fourier transformed infrared spectroscopy // Analytical Letters. 2018. Vol. 51. Issue 14. P. 2271–2294. <https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1423077>
11. Черепанов И.С. Синтез и изучение регулирующей активности N-карбоксифенил-L-рамнозиламинов // Вестник технологического университета. 2020. Т. 23. N 2. С. 5–8.
12. Montesinos V.J., Terrogn A., Fiol J.J., Moreno V., Caubet A. Synthesis and characterization of adenine histidine ternary complexes // Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry. 1993. Vol. 23. Issue 6. P. 937–947. <https://doi.org/10.1080/15533179308016873>
13. Fujita T., Sakaguchi T. Coordination and protonation sites of metal complexes containing adenine. Studies by infrared spectra // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1977. Vol. 25. Issue 9. P. 2419–2422. <https://doi.org/10.1248/cpb.25.2419>
14. Masoud M., El-Merghani A., Abd El-Kaway M. Structure and physico-chemical properties of biologically active purine complexes // Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-organic and Nano-metal Chemistry. 2009. Vol. 39. P. 535–553. <https://doi.org/10.1080/15533170903327844>
15. Hamada Y.Z., Greene J.T., Shields V., Pratcher M., Gardiner S., Waddell E., et al. Spectroscopic and potentiometric studies of the interaction of adenine with trivalent metal ions // Journal of Coordination Chemistry. 2010. Vol. 63. Issue 2. P. 284–295.

<https://doi.org/10.1080/00958970903377279>

16. Malek K., Podstawka E., Milecki J., Schroeder G., Proniewicz L. Structural features of the adenosines conjugate in means of vibrational spectroscopy and DFT // *Biophysical Chemistry*. 2009. Vol. 142. Issue 1-3. P. 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2009.02.007>

17. Zhabankov R.G., Sivchik V.V., Kolosova T.E. Vibrational spectra of monosaccharides which differ in the configuration of the CO(CH) groups // *Journal of Applied Spectroscopy*. 1980. Vol. 32. Issue 5. P. 472–477. <https://doi.org/10.1007/BF00612923>

18. Bailey L.E., Hernanz A., Navarro R., Theophanides T. Normal coordinate analysis and vibrational spectra of 9-β-D-arabinofuranosyladenine hydrochloride (Ara-A.HCl) // *European Biophysics Journal*. 1996. Vol. 24. Issue 3. P. 149–158. <https://doi.org/10.1007/BF00180272>

19. Suarez-Marina I., Abul-Haija Y., Turk-Macleod R., Gromski P.S., Cooper G.J.T., Olive A.O., et al. Integrated synthesis of nucleotide and nucleosides influenced by amino acids // *Communi-*

cation Chemistry. 2019. Vol. 2. Issue 28. 8 p. <https://doi.org/10.1038/s42004-019-0130-7>

20. Черепанов И.С. Образование вторичного продукта амадори в системе D-манноза – л-толуидин // Южно-сибирский научный вестник. 2019. Т. 26. N 2. С. 23–27. [https://doi.org/10.25699/SSSB.2019.2\(26\).32516](https://doi.org/10.25699/SSSB.2019.2(26).32516)

21. Abou Rayya M.S., Thanaa Sh.V., Naliba E.K. Photosynthetic pigments and fruit quality of Manzanillo olive as affected by 6-benzyladenine and studied the chemical constituents in leaves using Fourier transform infrared spectroscopy technique // *International Journal of ChemTech Research*. 2015. Vol. 8. Issue 6. P. 514–522.

22. Piotrowska A., Czerpak R., Adamowicz J., Biedrzycka A., Potocka A. Comparison of stimulatory effect of cytokinins adenine and urea derivatives on the level of some components in *Wolffia Arrhiza* (L.) Wimm (Lemnaceae) // *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2005. Vol. 74. Issue 2. P. 111–118. <https://doi.org/10.5586/asbp.2005.015>

REFERENCES

1. Mhatre V, Joshi V. Synthesis of new substituted 6-ureidopurines and 6-ureido-9-(2,3,5-triacetyl ribofuranosyl)purines having cytokinin (plant growth promoting) activity. *Indonesian Journal of Chemistry*. 2002;41B(12):2667–2675. <https://doi.org/10.1002/chin.200313195>

2. Mornet R, Theiler JB, Leonard NJ, Schmitz RY, Moore FH, Skoog F. Active cytokinins. Photoaffinity labeling agents to detect binding. *Plant Physiology*. 1979;64(4):600–610. <https://doi.org/10.1104/pp.64.4.600>

3. Mathlouthi M, Seuvre A-M, Koenig JL. FTIR and laser-Raman spectra of adenine and adenosine. *Carbohydrate Research*. 1984;131(1):1–15. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85398-7](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85398-7)

4. Maruyama T, Tanaka A, Oda M, Suzuki T, Oritani T. Synthesis and biological activity of new water-soluble cytokinins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1993;57(5):803–807. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.803>

5. Hart DS, Keightley A, Sappington D, Nguyen PTM, Chritton C, Seckinger GR, et al. Stability of adenine-based cytokinins in aqueous solutions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2016;52:1–9. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9734-5>

6. Nashalian O, Yaylayan V. Reactivity of nitrogen atoms in adenine and (Ade)₂Cu complexes towards ribose and 2-furanmethanol: formation of adenosine and kinetin. *Food Chemistry*. 2017;215:463–469. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.012>

7. Nam I, Nam HG, Zare RN. Abiotic synthesis of purine and pyrimidine ribonucleosides in aqueous microdroplets. *PNAS*. 2018;115(1):36–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718559115>

8. Knerr T, Osch S, Severin T. Reaction of guanosine, 2'-deoxyguanosine and guanosine-5'-mono-

phosphate with glucose. *Carbohydrate Research*. 1994;256(1):177–183. [http://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)84236-1](http://doi.org/10.1016/0008-6215(94)84236-1)

9. Larralde R, Robertson MP, Miller SL. Rates of decomposition of ribose and other sugars: Implication of chemical evolution. *PNAS*. 1995;92(18):8158–8160. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8158>

10. Sharma S, Uttam R, Singh P, Uttam K. Detection of vibrational spectroscopic biomarkers of the effect of gold nanoparticles of wheat seedlings using attenuated total reflectance Fourier transformed infrared spectroscopy. *Analytical Letters*. 2018;51(14):2271–2294. <https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1423077>

11. Cherepanov IS. Synthesis and study of plant growth activity synthesis and study of plant growth activity of N-carboxyphenyl-L-rhamnosylamines. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of the Technological University*. 2020;23(2):5–8. (In Russian)

12. Montesinos VJ, Terrogn A, Fiol JJ, Moreno V, Caubet A. Synthesis and characterization of adenine histidine ternary complexes. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry*. 1993;23(6):937–947. <https://doi.org/10.1080/15533179308016873>

13. Fujita T, Sakaguchi T. Coordination and protonation sites of metal complexes containing adenine. Studies by infrared spectra. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1977;25(9):2419–2422. <https://doi.org/10.1248/cpb.25.2419>

14. Masoud MS, El-Merghani A, Abd El-Kaway MY. Synthesis and physico-chemical properties of biologically active purine complexes. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*. 2009;39(9):537–553. <https://doi.org/10.1002/anie.200900537>

org/10.1080/15533170903327844

15. Hamada YZ, Greene JT, Shields V, Pratcher M, Gardiner S, Waddell E, et al. Spectroscopic and potentiometric studies of the interaction of adenine with trivalent metal ions. *Journal of Coordination Chemistry*. 2010;63(2):284–295. <https://doi.org/10.1080/00958970903377279>

16. Malek K, Podstawka E, Milecki J, Schroeder G, Proniewicz L. Structural features of the adenosines conjugate in means of vibrational spectroscopy and DFT. *Biophysical Chemistry*. 2009;142(1-3):17–26. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2009.02.007>

17. Zhbakov RG, Sivchik VV, Kolosova TE. Vibrational spectra of monosaccharides which differ in the configuration of the CO(CH) groups. *Journal of Applied Spectroscopy*. 1980;32(5):472–477. <https://doi.org/10.1007/BF00612923>

18. Bailey LE, Hernanz A, Navarro R, Theophanides T. Normal coordinate analysis and vibrational spectra of 9-β-D-arabinofuranosyladenine hydrochloride (Ara-A.HCl). *European Biophysics Journal*. 1996;24(3):149–158. <https://doi.org/10.1007/BF00180272>

19. Suarez-Marina I, Abul-Haija Y, Turk-Macleod

R, Gromski PS, Cooper GJT, Olive AO, et al. Integrated synthesis of nucleotide and nucleosides influenced by amino acids. *Communication Chemistry*. 2019. 2:28. <https://doi.org/10.1038/s42004-019-0130-7>

20. Cherepanov IS. Formation of secondary Amadori product in D-mannose – p-toluidine system. *Yuzno-Sibirskii nauchnyi vestnik = South-Siberian scientific bulletin*. 2019;26(2):23–27. (In Russian) [https://doi.org/10.25699/SSSB.2019.2\(26\).32516](https://doi.org/10.25699/SSSB.2019.2(26).32516)

21. Abou Rayya MS, Thanana ShV, Naliba EK. Photosynthetic pigments and fruit quality of Manzanillo olive as affected by 6-benzyladenine and studied the chemical constituents in leaves using Fourier transform infrared spectroscopy technique. *International Journal of ChemTech Research*. 2015;8(6):514–522.

22. Piotrowska A, Czerpak R, Adamowicz J, Biedrzycka A, Potocka A. Comparison of stimulatory effect of cytokinins adenine and urea derivatives on the level of some components in *Wolffia Arrhiza* (L.) Wimm (Lemnaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2005;74(2):111–118. <https://doi.org/10.5586/asbp.2005.015>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Черепанов Игорь Сергеевич,

к.х.н., доцент,
Удмуртский государственный университет,
426034, г. Ижевск, ул. Университетская, 1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: cherchem@mail.ru

Камашева Анна Александровна,

студентка,
Удмуртский государственный университет,
426034, г. Ижевск, ул. Университетская, 1,
Российская Федерация,
e-mail: cherchem@mail.ru

Кашапова Эльнара Ильдаровна,

студентка,
Удмуртский государственный университет,
426034, г. Ижевск, ул. Университетская, 1,
Российская Федерация,
e-mail: cherchem@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Поступила в редакцию 14.03.2021.
Одобрена после рецензирования 20.05.2021.
Принята к публикации 31.05.2021.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Igor S. Cherepanov,

Cand. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Udmurt State University,
1, Universitetskaya St., Izhevsk, 426034,
Russian Federation,
✉ e-mail: cherchem@mail.ru

Anna A. Kamasheva,

Student,
Udmurt State University,
1, Universitetskaya St., Izhevsk, 426034,
Russian Federation,
e-mail: cherchem@mail.ru

El'nara I. Kashapova,

Student,
Udmurt State University,
1, Universitetskaya St., Izhevsk, 426034,
Russian Federation,
e-mail: cherchem@mail.ru

Contribution of the authors

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

Conflict interests

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

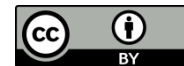
The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

The article was submitted 14.03.2021.
Approved after reviewing 20.05.2021.
Accepted for publication 31.05.2021.

Оригинальная статья / Original article

УДК 544.72

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-318-325>



Адсорбция нефтепродуктов модифицированными и активированными адсорбентами

© А.Д. Чугунов, Е.Г. Филатова

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

Резюме: Целью работы явилось исследование адсорбции нефтепродуктов из водных растворов адсорбентами, модифицированными HCl и активированными СВЧ-излучением. В качестве объектов исследования были использованы углеродные адсорбенты – активные угли: АД-05-2, ИПИ-Т, КАД-йодный, и цеолиты Забайкальского месторождения. Количественный анализ вод (модельных растворов с исходной концентрацией нефтепродуктов не более 10 мг/л) проводили флуориметрическим методом на анализаторе жидкости Флуорат-02. Активирование адсорбентов осуществляли в СВЧ-печи при мощности волн 800 Вт в течение 1 мин. Модифицирование осуществляли по следующей методике: 10 г высушенных до постоянной массы при температуре 120–150 °С адсорбентов перемешивали 24 ч с 200 мл 12%-го раствора HCl в воде. Затем суспензию фильтровали и промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции. В ходе исследования установлено, что величина адсорбции нефтепродуктов адсорбентами, модифицированными HCl, возрастает в 3,8 раза для активного угля КАД-йодный, в 0,5 раза – для ИПИ-Т, и принимает значения 0,71 и 0,80 мг/г соответственно. Эти сорбенты имеют наиболее крупный размер зерен – 3–5 мм, и наибольший объем микропор – 0,28–0,29 см³/г. Установлено, что метод краткосрочной (в течение 1 мин) СВЧ-активации позволяет увеличить адсорбцию нефтепродуктов: в 4,2 раза – для активного угля КАД-йодный, в 0,6 раза – для ИПИ-Т, по сравнению с исходными адсорбентами. Наибольшая величина адсорбции нефтепродуктов соответствует цеолитам и принимает значение 0,99 мг/г. Действие СВЧ-излучения происходит за счет диссоциации и испарения связанной в адсорбентах воды и легковоспламеняющихся органических веществ, что ведет к увеличению пористости адсорбента. Применение метода СВЧ-активации является весьма перспективным по сравнению с классическими методами химического и парогазового активирования, так как позволяет упростить технологическое оформление и снизить расход реагентов на производство эффективных адсорбентов, используемых для извлечения нефтепродуктов из водных растворов. Особенно это становится важным в контексте поддержания экологической безопасности водопользования.

Ключевые слова: активные угли, цеолиты, нефтепродукты, адсорбция, модифицирование HCl, активация СВЧ-излучением, безопасность водопользования

Для цитирования: Чугунов А.Д., Филатова Е.Г. Адсорбция нефтепродуктов модифицированными и активированными адсорбентами. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 2. С. 318–325. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-318-325>

Adsorption of petroleum products by modified and activated adsorbents

Alexsandr D. Chugunov, Elena G. Filatova

Irkutsk National Research Technical University,
Irkutsk, Russian Federation

Abstract: This research is aimed at investigating the adsorption of petroleum products from aqueous solutions by adsorbents modified with HCl and those activated by microwave radiation. The research objects were carbon adsorbents: activated coals, such as AD-05-2, IPI-T, KAD-iodine and zeolites of the Trans-Baikal deposit. The quantitative analysis of waters (standardised test solutions with an initial concentration of petroleum products not exceeding 10 mg/l) was carried out by the fluorimetric method using a Fluorat-02 liquid analyser. The adsorbents were activated in a microwave oven at a wave power of 800 W for 1 min. The modification was carried out according to the following procedure: 10 g of the adsorbents dried to a constant weight at a temperature of 120–150 °C were stirred for 24 h with 200 ml of a 12% HCl solution in water.

Next, the suspension was filtered and washed with distilled water until neutral. It was found that the value of adsorption of petroleum products by adsorbents modified with HCl increases by 3.8 times for activated carbon KAD-iodine, 0.5 times for IPI-T, and equals 0.71 mg/g and 0.80 mg/g respectively. Among the studied sorbents, these sorbents have the largest grain size (3–5 mm) and micropore volume (0.28–0.29 cm³/g). It was established that the method of short-term (within 1 min) microwave activation makes it possible to increase the adsorption of petroleum products by: 4.2 times for activated carbon KAD-iodine and 0.6 times for IPI-T in comparison with the original adsorbents. The highest adsorption value of petroleum products corresponds to zeolites and equals 0.99 mg/g. The action of microwave radiation is associated with the dissociation and evaporation of the water bound in the adsorbents and flammable organic substances, which leads to an increase in the porosity of the adsorbent. The application of the microwave activation method is highly promising in comparison with the classic methods of chemical and steam-gas activation. This method simplifies the technological design and reduces the consumption of reagents for the production of effective adsorbents used to extract petroleum products from aqueous solutions, which acquires particular importance in the context of maintaining the environmental safety of water use.

Keywords: active coals, zeolites, petroleum products, adsorption, modification with HCl, activation by microwave radiation, safety of water use

For citation: Chugunov AD, Filatova EG. Adsorption of petroleum products by modified and activated adsorbents. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2):318–325. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-318-325>

ВВЕДЕНИЕ

На всех стадиях нефтепользования, начиная от добычи нефти и заканчивая утилизацией ее отходов, происходит загрязнение атмосферы, почв и водоемов. Все предприятия по добыче, переработке, хранению и транспортировке нефти и нефтепродуктов являются крупнейшими техногенными и антропогенными загрязнителями. И чем больший объем работ выполняется, тем сильнее их отрицательное влияние на окружающую среду. Аварийные ситуации при этом лишь увеличивают и концентрируют это влияние¹. Поэтому проблема эффективной очистки нефтесодержащих природных и сточных вод является одной из наиболее актуальных, что подтверждают многочисленные исследования [1–8].

В настоящее время очистку сточных вод от нефтепродуктов осуществляют различными углеродными и минеральными адсорбентами, часто используют золу, отходы ТЭЦ и др. Широко используют активные угли – БАУ-А, ДАГ, АГ-З, КАД-йодный, АГ-ОВ, ДАУ и др. Выбор адсорбентов, как правило, определяется рядом факторов: эффективностью очистки, удалением вредных веществ до требуемых норм ПДК, способностью адсорбента к регенерации, его доступностью и стоимостью. Также представляется целесообразным поиск новых эффективных адсорбентов, удовлетворяющих вышеуказанным требованиям. К таковым относятся природные цеолиты, физико-химические свойства которых можно улучшить модифицированием их поверхности органическими или неорганическими соединениями. Огромные запасы природных цеолитов, доступность и низкая себестоимость позволяют прогнозировать их долгосрочное прак-

тическое применение. В связи с этим особое значение имеет соотношение эффективности к затратам на производство применяемых при ликвидации экологических катастроф адсорбентов [9–12], которое во многом определяется сырьем [13–16], методами и конкретной технологией их получения [17–21].

Сегодня существует два основных метода активирования адсорбентов: химический и парогазовый. Однако они имеют ряд принципиальных недостатков. Так, химическое активирование связано с внесением активирующих агентов в продукт, что требует дальнейшей очистки последнего. Парогазовое же активирование отличается высокой температурой процесса – до 800–1000 °С. Все это усложняет технологическое оформление процесса, а также делает необходимым применение специальных материалов для изготовления оборудования. Нивелировать данные недостатки способен метод активации посредством СВЧ-излучения, который уже находит применение при сушке материалов [22].

Целью работы явилось исследование адсорбции нефтепродуктов из водных растворов активными углями и природными цеолитами Забайкальского месторождения, модифицированными HCl и активированными СВЧ-излучением.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования использовали углеродные адсорбенты – активные угли: АД-05-2, ИПИ-Т, КАД-йодный, и цеолиты Забайкальского месторождения. Адсорбционные характеристики углеродных адсорбентов представлены в табл. 1.

¹Экологическими катастрофами последних лет, например, в Сибирском федеральном округе, можно считать аварии на Жилкинской нефтебазе (АО «Иркутскнефтепродукт», 2018 г.), Норильской ТЭЦ (АО «Норильско-Таймырская энергетическая компания», 2020 г.) и др.

Таблица 1. Адсорбционные характеристики углеродных адсорбентов

Table 1. Adsorption characteristics of carbon adsorbents

| Углеродные адсорбенты | Объем пор, см ³ /г | | | | Размер зерен, мм | Удельная поверхность, м ² /г | Насыпная плотность, г/дм ³ |
|-----------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|------------------|---|---------------------------------------|
| | V _{суммарный} | V _{макро} | V _{мезо} | V _{микро} | | | |
| АД-05-2 | 0,69 | 0,34 | 0,12 | 0,23 | 1–2 | 620 | 550 |
| ИПИ-Т | 0,65 | 0,31 | 0,06 | 0,28 | 3–5 | 480 | 420 |
| КАД-йодный | 0,70 | 0,35 | 0,06 | 0,29 | 3–5 | 513 | 450 |

Как видно из данных, представленных в табл. 1, наибольшее значение удельной поверхности соответствует углеродному адсорбенту АД-05-2, суммарный объем пор у исследуемых образцов различается незначительно.

Для исследования адсорбции нефтепродуктов из водных растворов использовали также цеолиты Забайкальского месторождения, текстурные характеристики которых представлены в табл. 2.

Таблица 2. Текстурные характеристики цеолитов Забайкальского месторождения

Table 2. Characteristics of the zeolite of the Zabaikalsky field

| Характеристика | Значение |
|---|-------------|
| Цеолитовый модуль (Si/Al) | 3,2 |
| Размер зерен, мм | 1–2 |
| Механическая прочность (ГОСТ 16188), % | Не менее 90 |
| Влагосодержание, % | 20 |
| Удельная поверхность, м ² /г | 33 |
| Пористость, % | 23 |
| Средний размер пор, нм | 1,8 |
| Удельный объем пор, см ³ /г | 0,015 |

Как видно из приведенных в табл. 2 данных, удельная поверхность и суммарный объем пор уступают углеродным адсорбентам более чем в 15 и 40 раз соответственно.

Для улучшения физико-химических характеристик активных углей и цеолитов проводили их модификацию соляной кислотой. Модификацию образцов HCl осуществляли в соответствии с методикой, представленной в диссертационной работе И.Г. Хальченко²: 10 г высушенных до постоянной массы при температуре 120–150 °С адсорбентов перемешивали 24 ч с 200 мл 12%-го раствора HCl в воде. Затем суспензию фильтровали и промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции. Полученные модифицированные адсорбенты сушили до постоянной массы и анализировали на содержание основных элементов. При этом увеличение массы образцов составило не менее 20%.

Для увеличения адсорбционных характери-

стик исследуемых адсорбентов проведено их активирование СВЧ-излучением. Активирование адсорбентов осуществляли в СВЧ-печи модели Bosch FEM513MB0 при мощности волн 800 Вт и энергопотреблении 1270 Вт в течение 1 мин.

Изменение концентрации нефтепродуктов в исследуемых пробах модельных растворов осуществляли флуориметрическим методом на анализаторе жидкости Флюорат-02. Погрешность измерения составила не более 0,05%.

Расчет величины адсорбции производили по уравнению:

$$A = \frac{(C_0 - C_p)V}{m},$$

где C_0 и C_p – исходная и равновесная концентрация нефтепродуктов соответственно, мг/л; V – объем раствора, л; m – масса сорбента, г (масса каждого образца составляла 1 г).

Исходная концентрация нефтепродуктов в модельных растворах составляла не более 10 мг/л. Модельные растворы готовили методом разбавления. При приготовлении исходных растворов в качестве нефтепродуктов использовали дизельное масло марки ДТ-Л-К5 ($\rho_{cp} = 0,8325$ г/см³). Масса навески каждого образца адсорбента – 1 г.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По полученным результатам исследований построены гистограммы адсорбции и остаточной концентрации нефтепродуктов. На рис. 1 и 2 приведены данные для исходных образцов адсорбентов.

Как видно из гистограмм, представленных на рис. 1, наибольшая величина адсорбции нефтепродуктов активными углями соответствует углеродному адсорбенту АД-05-2, еще большее значение – 0,92 мг/г – цеолиту. Данный факт можно связать с низкой концентрацией нефтепродуктов в водном растворе. Остаточная концентрация нефтепродуктов в случае цеолитов составила 0,81 мг/л.

На рис. 3 и 4 приведены гистограммы, отражающие величину адсорбции и остаточную концентрацию нефтепродуктов для адсорбентов, модифицированных HCl.

²Хальченко И.Г. Физико-химические методы очистки сточных вод с использованием модифицированных форм природных силикатов: дисс. ... канд. хим. наук: 03.02.08 / Хальченко Ирина Григорьевна. Владивосток, 2015. 125 с.

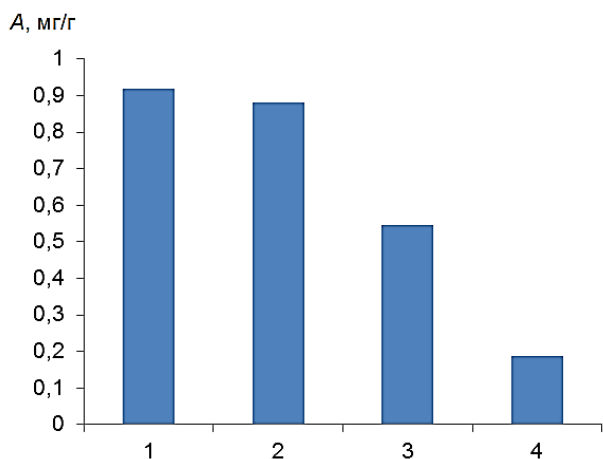


Рис. 1. Адсорбция нефтепродуктов исходными адсорбентами: 1 – цеолитами; 2 – АД-05-2; 3 – ИПИ-Т; 4 – КАД-йодным

Fig. 1. Petroleum products adsorption by initial adsorbents: 1 – zeolites; 2 – AD-05-2; 3 – IPI-T; 4 – CAD-iodine

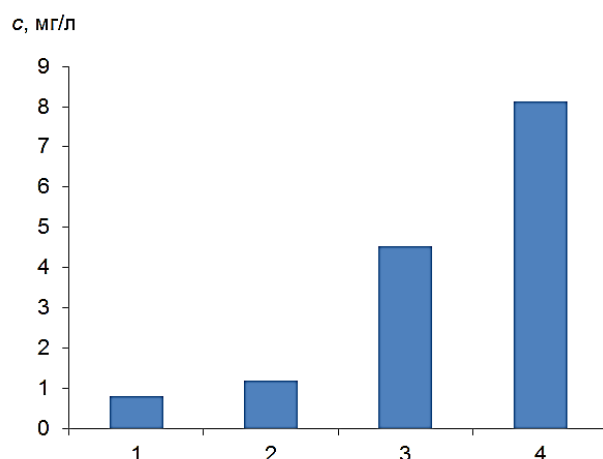


Рис. 2. Остаточная концентрация нефтепродуктов для: 1 – цеолитов; 2 – АД-05-2; 3 – ИПИ-Т; 4 – КАД-йодного

Fig. 2. Residual concentration of petroleum products for: 1 – zeolites; 2 – AD-05-2; 3 – IPI-T; 4 – CAD-iodine

Как видно из данных, представленных на рис. 3, величина адсорбции нефтепродуктов адсорбентами, модифицированными HCl, возрастает в 3,8 раза для активного угля КАД-йодный, в 0,5 раза – для ИПИ-Т, и принимает значения 0,71 и 0,80 мг/г соответственно. Эти сорбенты имеют наиболее крупный размер зерен – 3–5 мм, и наибольший объем микропор – 0,28–0,29 см³/г. Наибольшая величина адсорбции нефтепродуктов соответствует цеолитам и имеет значение 0,95 мг/г. Остаточная концентрация нефтепродуктов в случае цеолитов составила 0,53 мг/л (см. рис. 4). Известно, что при модифицировании алюмосиликатов HCl более чем в два раза увеличивается удельная поверхность адсорбента и удельный объем пор. При этом средний размер

пор сокращается от 1,8 до 1,6 нм [23, 24]. Очевидно, что при модифицировании происходит удаление ионов алюминия из бесконечного тетраэдрического каркаса сорбента, образованного AlO₄ и SiO₄. Это приводит к разрушению основного компонента цеолита и уплотнению силикатного слоя адсорбента.

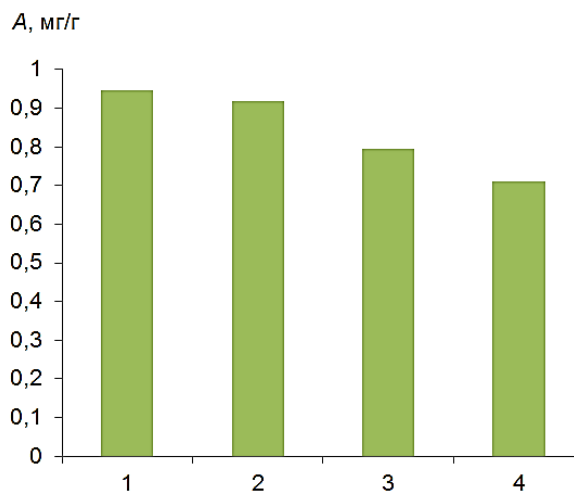


Рис. 3. Адсорбция нефтепродуктов модифицированными адсорбентами: 1 – цеолитами; 2 – АД-05-2; 3 – ИПИ-Т; 4 – КАД-йодным

Fig. 3. Petroleum products adsorption by modified adsorbents: 1 – zeolites; 2 – AD-05-2; 3 – IPI-T; 4 – CAD-iodine

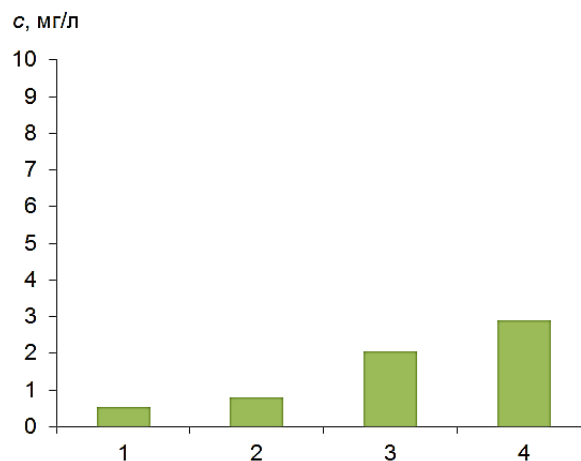


Рис. 4. Остаточная концентрация нефтепродуктов для модифицированных: 1 – цеолитов; 2 – АД-05-2; 3 – ИПИ-Т; 4 – КАД-йодного

Fig. 4. Residual concentration of petroleum products for modified: 1 – zeolites; 2 – AD-05-2; 3 – IPI-T; 4 – CAD-iodine

На рис. 5 и 6 приведены данные для адсорбентов, активированных СВЧ-излучением.

Как видно из данных, представленных на рис. 5, величина адсорбции нефтепродуктов адсорбентами, активированными СВЧ-излучением,

возрастает в 4,2 раза для активного угля КАД-йодный, в 0,6 раза – для ИПИ-Т, по сравнению с исходными адсорбентами и принимает значения 0,80 и 0,87 мг/г соответственно. Наибольшая величина адсорбции нефтепродуктов соответствует цеолитам и принимает значение 0,99 мг/г. Остаточная концентрация нефтепродуктов в случае цеолитов составила 0,02 мг/л (см. рис. 6). При этом предельно допустимая концентрация нефтепродуктов для водоемов рыбохозяйственного назначения составляет 0,05 мг/л. Активирование адсорбентов СВЧ-излучением позволяет добиться требуемых показателей очистки.

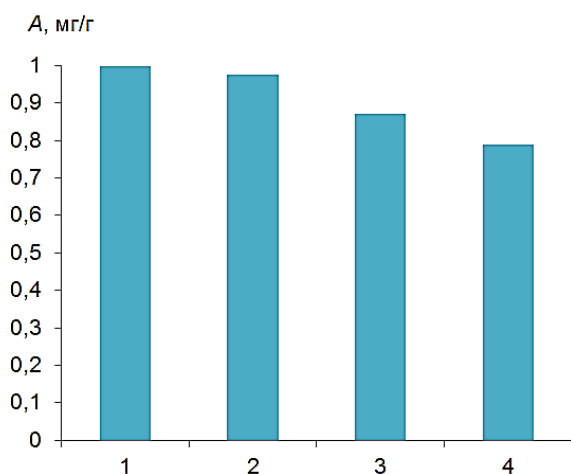


Рис. 5. Адсорбция нефтепродуктов активированными адсорбентами: 1 – цеолитами; 2 – АД-05-2; 3 – ИПИ-Т; 4 – КАД-йодным

Fig. 5. Petroleum products adsorption by activated adsorbents: 1 – zeolites; 2 – AD-05-2; 3 – IPI-T; 4 – CAD-iodine

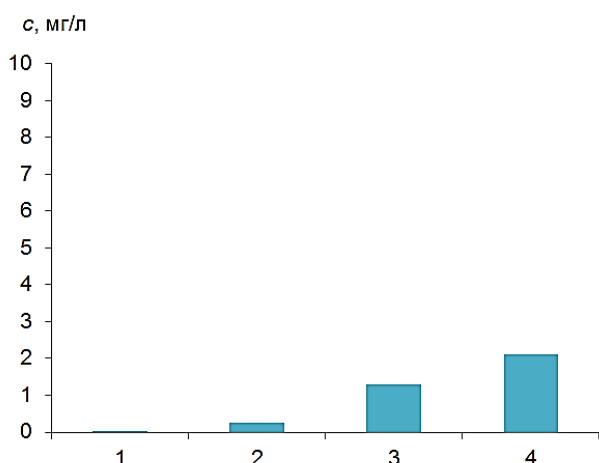


Рис. 6. Остаточная концентрация нефтепродуктов для активированных: 1 – цеолитов; 2 – АД-05-2; 3 – ИПИ-Т; 4 – КАД-йодного

Fig. 6. Residual concentration of petroleum products for activated: 1 – zeolites; 2 – AD-05-2; 3 – IPI-T; 4 – CAD-iodine

Таким образом, активирование адсорбентов СВЧ-излучением позволило повысить величину адсорбции нефтепродуктов активным углем КАД-йодный на 11%, ИПИ-Т – на 9,4%, АД-05-2 – на 5,6%, и цеолитом – на 5,1% по сравнению с образцами, модифицированными HCl.

При активации адсорбентов возможен следующий механизм процесса адсорбции:

- внутренний нагрев СВЧ-излучением до возникновения водно-органической фазы под высоким давлением, частичный разлом на небольшое количество трещин при сбросе внутреннего давления;

- формирование нанокластеров при охлаждении газовых органических составляющих,двигающихся по отдельным каналам, их коагуляционный рост;

- выход аэрозолей из кратеров в окружении органической составляющей и ее воспламенение в зонах контакта с воздухом при достижении соответствующих температур;

- вынос наночастиц минеральных составляющих (окиси алюминия или кремния) с их последующим воспламенением через механизм образования ОН-радикала.

Приведенные результаты по адсорбции нефтепродуктов исследуемыми образцами свидетельствуют об эффективности использования активации адсорбентов посредством СВЧ-излучения. Экспериментальные данные подтверждают, что величина адсорбции нефтепродуктов адсорбентами, модифицированными HCl, имеет меньшие значения в сравнении с образцами, активированными СВЧ-излучением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что наибольшая величина адсорбции нефтепродуктов при модифицировании исследуемых образцов HCl характерна для цеолитов – 0,95 мг/г. При этом остаточная концентрация нефтепродуктов составила 0,53 мг/л.

Показано, что активирование адсорбентов СВЧ-излучением позволило повысить величину адсорбции нефтепродуктов активным углем КАД-йодный на 11%, ИПИ-Т – на 9,4%, АД-05-2 – на 5,6%, и цеолитом – на 5,1% по сравнению с образцами, модифицированными HCl.

Таким образом, в ходе работы были получены результаты, свидетельствующие о целесообразности применения метода активации адсорбентов посредством СВЧ-излучения. Данный метод активации позволяет упростить технологическое оформление и снизить затраты на химические реагенты при производстве адсорбентов. Однако необходимо отметить энергоемкость данного метода.

Дальнейшее изучение влияния СВЧ-активации на физико-химические свойства адсорбентов, в том числе адсорбционные и регенеративные, способно открыть новые сферы их применения и снизить затраты при производстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kalantarnia M., Khan F., Hawboldt K. Modeling of BP Texas City refinery accident using dynamic risk assessment approach Progress safety and environmental protection // Progress Safety and Environmental Protection. 2010. Vol. 88. Issue 3. P. 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2010.01.004>
2. Cheevaporn V., Menasveta P. Water pollution and habitat degradation in the Gulf of Thailand // Marine pollution bulletin. 2003. Vol. 47. Issue 1-6. P. 43–51. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00101-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00101-2)
3. Schnaak W., Kuchler T., Kujawa M., Henschel K., Sussenbach D., Donau R. Organic contaminants in sewage sludge and their ecotoxicological significance in the agricultural utilization of sewage sludge // Chemosphere. 1997. Vol. 35. Issue 1-2. P. 5–11. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)88285-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)88285-9)
4. Trelu C., Mousset E., Pechaud Y., Huguenot D., van Hullebusch E.D., Esposito G., et al. Removal of hydrophobic organic pollutants from soil washing/flushing solutions: A critical review // Journal of Hazardous Materials. 2016. Vol. 306. P. 149–174. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.008>
5. Bazrafshan E., Amirian P., Mahvi A.H., Ansari-Moghaddam A. Application of adsorption process for phenolic compounds removal from aqueous environments: a systematic review // Global Nest Journal. 2016. Vol. 18. Issue 1. P. 146–163. <https://doi.org/10.30955/gnj.001709>
6. Краснова Т.А., Аникина А.В., Беляева О.В. Очистка сточных вод от анилина с использованием углеродных адсорбентов // Ползуновский вестник. 2011. N 4-2. С. 152–154.
7. Долгих О.Г., Овчаров С.Н. Использование углеродных адсорбентов на основе растительных отходов для очистки нефтезагрязненных сточных вод // Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета. 2010. N 1. С. 6–12.
8. Мазлова Е.А., Иса Ж.Д. Исследование процессов очистки нефтезагрязненных сточных вод с использованием адсорбентов // Нефтепереработка и нефтехимия. Научно-технические достижения и передовой опыт. 2008. N 12. С. 34–38.
9. Со Вин Мьинт, Си Тху Аунг, Клушин В.Н. К оценке рациональных условий переработки на углеродные адсорбенты шелухи риса и скорлупы коксовых орехов республики Мьянма // Успехи в химии и химической технологии. 2014. Т. 28. N 5. С. 8–10.
10. Пат. № 2527221, Российская Федерация. Способ получения активного угля из растительных отходов / В.М. Мухин, Н.Л. Воропаева, В.В. Карпачев, С.А. Харламов, Ю.Я. Спиридонов, В.В. Гурьянов [и др.]; патентообладатель ОАО «Электростальское НПО «Неорганика»»; заявл. 09.04.2013; опубл. 27.08.2014. Бюл. № 24.
11. Пат. № 2490207, Российская Федерация. Способ получения активированного угля / И.В. Воскобойников, В.А. Кондратюк, С.А. Константинова, В.М. Щелоков, Э.Ф. Гаврилов, А.О. Шевченко; патентообладатель Министерство промышленности и торговли РФ; заявл. 28.10.2010; опубл. 20.08.2013. Бюл. № 13.
12. Ali I., Asim M., Khan T.A. Low cost adsorbents for the removal of organic pollutants from wastewater // Journal of Environmental Management. 2012. Vol. 113. P. 170–183. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.08.028>
13. Hasan D.B., Wan D.W.M.A., Raman A.A.A. Treatment technologies for petroleum refinery effluents: A review // Process Safety and Environmental Protection. 2011. Vol. 89. Issue 2. P. 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2010.11.003>
14. Zubot W., MacKinnon M.D., Chelme-Ayala P., Smith D.W., El-Din M.G. Petroleum coke adsorption as a water management option for oil sands process-affected water // Science of the Total Environment. 2012. Vol. 427-428. P. 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.024>
15. Shirmardi M., Mahvi A., Hashemzadeh B., Naeimabadi A., Hassani G., Niri M.V. The adsorption of malachite green (MG) as a cationic dye onto functionalized multi walled carbon nanotubes // Korean Journal of Chemical Engineering. 2013. Vol. 30. Issue 8. P. 1603–1608. <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0080-1>
16. Hubbe M., Rojas O.J., Fingas M., Gupta B. Cellulosic substrates for removal of pollutants from aqueous systems: a review. 3. Spilled oil and emulsified organic liquid // Bioresources. 2013. Vol. 8. Issue 2. P. 3038–3097. <https://doi.org/10.15376/biores.8.2.3038-3097>
17. Anirudhan T.S., Sree Kumari S.S., Bringle C.D. Removal of phenols from water and petroleum industry refinery effluents by activated carbon obtained from coconut coir pith // Adsorption. 2009. Vol. 15. Issue 5-6. P. 439–451. <https://doi.org/10.1007/s10450-009-9193-6>
18. Текуева К.М., Клушин В.Н., Антипова О.В. Экспериментальная оценка рациональных условий получения активированных углей из фрагментов косточек абрикосов и персиков – отходов пищевых предприятий республики Кабардино-Балкария // Успехи в химии и химической технологии. 2013. Т. 27. N 9 (149). С. 31–34.
19. Солодкова А.Б., Собгайда Н.А., Шайхиев И.Г. Разработка технологии изготовления и использования адсорбента на основе активного ила для очистки сточных вод // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. N 20. С. 179–182.
20. Kravchenko G.V., Domoroshchina E.N., Kuz'micheva G.M., Gaynanova A.A., Amarantov S.V., Pirutko L.V., et al. Zeolite–titanium dioxide nanocomposites: Preparation, characterization, and adsorption properties // Nanotechnologies in Russia.

2016. Vol. 11. Issue 9-10. P. 579–592. <https://doi.org/10.1134/S1995078016050098>

21. Шарифканова Г.Н., Сулейменова М.Ш., Ибрашева Р.К. Получение декатионированных и диалюминированных цеолитов // Вестник Алма-тинского технологического университета. 2015. N 4. С. 105–109.

22. Коновалов Н.П., Коновалов П.Н., Хайдурова А.А. Микроволновое излучение в технологии сушки угля // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2015. N 1 (12). С. 74–79.

23. Филатова Е.Г., Соболева В.Г. Извлечение

нефти и нефтепродуктов из водных растворов природными адсорбентами // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. 2019. Т. 62. N 6. С. 131–137. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20196206.5836>

24. Filatova E.G., Pomazkina O.I., Pozhidaev Y.N. Adsorption of nickel(ii) and copper(ii) ions by modified aluminosilicates // *Protections of Metals and Physical and Chemistry of Surfaces*. 2017. Vol. 53. Issue 6. P. 999–1004. <https://doi.org/10.1134/S2070205117060259>

REFERENCES

1. Kalantarnia M, Khan F, Hawboldt K. Modeling of BP Texas City refinery accident using dynamic risk assessment approach *Progress safety and environmental protection*. *Progress Safety and Environmental Protection*. 2010;88(3):191–199. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2010.01.004>

2. Cheevaporn V, Menasveta P. Water pollution and habitat degradation in the Gulf of Thailand. *Marine Pollution Bulletin*. 2003;47(1-6):43–51. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00101-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00101-2)

3. Schnaak W, Kuchler T, Kujawa M, Henschel K, Sussenbach D, Donau R. Organic contaminants in sewage sludge and their ecotoxicological significance in the agricultural utilization of sewage sludge. *Chemosphere*. 1997;35(1-2):5–11. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)88285-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)88285-9)

4. Trelle C, Mousset E, Pechaud Y, Huguenot D, van Hullebusch ED, Esposito G, et al. Removal of hydrophobic organic pollutants from soil washing/flushing solutions: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*. 2016;306:149–174. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.008>

5. Bazrafshan E, Amirian P, Mahvi AH, Ansari-Moghaddam A. Application of adsorption process for phenolic compounds removal from aqueous environments: a systematic review. *Global NEST Journal*. 2016;18(1):146–163. <https://doi.org/10.30955/gnj.001709>

6. Krasnova TA, Anikina AV, Belyaeva OV. Wastewater treatment from aniline using carbon adsorbents. *Polzunovskiy vestnik*. 2011;4-2:152-154. (In Russian)

7. Dolgikh OG, Ovcharov SN. The use of carbon adsorbents based on plant waste for the purification of oil-contaminated wastewater. *Vestnik Severo-Kavkazskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta = Bulletin of the North Caucasus State Technical University*. 2010;1:6–12. (In Russian)

8. Mazlova EA, Isa ZhD. Study of the purification processes of oil-contaminated effluents with use of adsorbents. *Neftepererabotka i neftekhimiya. Nauchno-tekhnicheskie dostizheniya i peredovoi opyt = Refining and petrochemistry. Scientific and technical achievements and best practices*. 2008;12:34–38. (In Russian)

9. Saw Vin M'int, Si Thu Aung, Klushin VN. To

the assessment of rational processing conditions of rice husk and coconut shells of the republic of Myanmar into carbon adsorbents. *Uspekhi v khimii i khimicheskoi tekhnologii*. 2014;28(5):8–10. (In Russian)

10. Mukhin VM, Voropaeva NL, Karpachev VV, Kharlamov SA, Spiridonov JJ, Gur'janov VV, et al. *Method of producing activated charcoal from plant wastes*. Patent RF, no. 2527221; 2013. (In Russian)

11. Voskoboinikov IV, Kondratyuk VA, Konstantinova SA, Shchelokov VM, Gavrillov EF, Shevchenko AO. *Method of obtaining activated coal*. Patent RF, no. 2490207; 2010. (In Russian)

12. Ali I, Asim M, Khan TA. Low cost adsorbents for the removal of organic pollutants from wastewater. *Journal of Environmental Management*. 2012;113:170–183. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.08.028>

13. Hasan DB, Wan DWMA, Raman AAA. Treatment technologies for petroleum refinery effluents: A review. *Process Safety and Environmental Protection*. 2011;89(2):95–105. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2010.11.003>

14. Zubot W, MacKinnon MD, Chelme-Ayala P, Smith DW, El-Din MG. Petroleum coke adsorption as a water management option for oil sands process-affected water. *Science of the Total Environment*. 2012;427-428:364–372. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.024>

15. Shirmardi M, Mahvi A, Hashemzadeh B, Naeimabadi A, Hassani G, Niri MV. The adsorption of malachite green (MG) as a cationic dye onto functionalized multi walled carbon nanotubes. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2013;30(8):1603–1608. <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0080-1>

16. Hubbe M, Rojas OJ, Fingas M, Gupta B. Cellulosic substrates for removal of pollutants from aqueous systems: a review. 3. Spilled oil and emulsified organic liquid. *Bioresources*. 2013;8(2):3038–3097. <https://doi.org/10.15376/biores.8.2.3038-3097>

17. Anirudhan TS, Sreekumari SS, Bringle CD. Removal of phenols from water and petroleum industry refinery effluents by activated carbon obtained from coconut coir pith. *Adsorption*. 2009;15(5-6):439–451. <https://doi.org/10.1007/s10450-009-9193-6>

18. Tekueva KM, Klushin VN, Antipova OV. Ex-

perimental evaluation of rational conditions of obtaining active coal pit fragments of peaches and apricots – waste food enterprises in the republic of Kabardino-Balkaria. *Uspekhi v khimii i khimicheskoi tekhnologii*. 2013;27(9):31–34. (In Russian)

19. Solodkova AB, Sobgaida NA, Shaikhiev IG. Development of technology for the manufacture and use of an adsorbent based on activated sludge for wastewater treatment. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of Kazan Technological University*. 2012;15(20):179–182. (In Russian)

20. Kravchenko GV, Domoroshchina EN, Kuz'micheva GM, Gaynanova AA, Amarantov SV, Pirutko LV, et al. Zeolite–titanium dioxide nanocomposites: Preparation, characterization, and adsorption properties. *Nanotechnologies in Russia*. 2016;11(9-10):579–592. <https://doi.org/10.1134/S1995078016050098>

21. Sharifkanova GN, Suleimenova MSh, Ibrasheva RK. Obtaining decationized and dialuminized zeolites. *Vestnik Almatinskogo tekhnolo-*

gicheskogo universiteta = The Journal of Almaty Technological University. 2015;4:105-109. (In Russian)

22. Konovalov NP, Konovalov PN, Khaidurova AA. Microwave radiation in coal drying technology. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2015;1:74–79. (In Russian)

23. Filatova EG, Soboleva VG. Extraction of oil and petroleum products from water solutions by natural adsorbents. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Seriya: Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya = Russian Journal of Chemistry and Chemical Technology*. 2019;62(6):131–137. (In Russian) <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20196206.5836>

24. Filatova EG, Pomazkina OI, Pozhidaev YN. Adsorption of nickel(II) and copper(II) ions by modified aluminosilicates. *Protections of Metals and Physical and Chemistry of Surfaces*. 2017;53(6):999–1004. <https://doi.org/10.1134/S2070205117060259>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Чугунов Александр Дмитриевич,

аспирант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: chugunovsasha1996@yandex.ru

Филатова Елена Геннадьевна,

к.т.н., доцент,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉ e-mail: efila@list.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.

Поступила в редакцию 10.11.2020.
Одобрена после рецензирования 12.12.2020.
Принята к публикации 31.05.2021.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Alexsandr D. Chugunov,

Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: chugunovsasha1996@yandex.ru

Elena G. Filatova,

Cand. Sci. ((Engineering),
Associate Professor,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉ e-mail: efila@list.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

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

The article was submitted 10.11.2020.
Approved after reviewing 12.12.2020.
Accepted for publication 31.05.2021.



Исследование эффективности ингибиторов коррозии на основе производных изотиурониевых солей

© И.А. Ушаков*, В.С. Никонова*, И.В. Польшинский**,
Л.Г. Князева***, М.М. Польшинская****, Е.А. Анциферов**

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

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

***Всероссийский научно-исследовательский институт использования техники
и нефтепродуктов в сельском хозяйстве, г. Тамбов, Российская Федерация

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

Резюме: Роль металлов в промышленности крайне важна, их использование постоянно растет. Практически невозможно найти хотя бы одну промышленную область, которая обходилась бы без использования металлов и их сплавов. Но из-за снижения качества металла в процессе эксплуатации возникает коррозия не только на его поверхности, но и под покрытием, что приводит к его разрушению. Чтобы избежать этого, необходимо применять ингибиторы коррозии. Широкое применение в качестве ингибиторов коррозии получили органические соединения. В настоящее время разработано множество органических ингибиторов коррозии. В литературе описаны органические соединения, в состав которых входят гетероатомы N, O, S и P, что снижает скорость коррозии. Органические соединения адсорбируются на поверхности металла, образуя тонкий слой. Адсорбция происходит либо за счет электростатического взаимодействия, либо, в некоторых случаях, за счет образования ковалентных связей. Целью работы являлось исследование изотиурониевых солей в качестве ингибиторов коррозии, оценка их защитных свойств методом поляризационных кривых. Объектами исследований выступили изотиурониевые соединения, содержащие два активных центра, разделенных насыщенными и ненасыщенными углеродными связями (структуры 1–3). В структурах 4–7 один изотиурониевый фрагмент имеет разные пропиленовые заместители. Ранее было показано, что эти соединения могут выступать как эффективные блескообразователи при нанесении никелевых покрытий. Для исследования ингибиторов коррозииготавливали модельный раствор плотностью 1,12 г/см³. Концентрация ингибитора коррозии составляла 400 мг/л. Как показали исследования, соединения, имеющие два изотиурониевых фрагмента, не всегда показывают улучшение свойств для ингибирования разрушения металла в коррозионной среде. В частности, на образцах из стали марки Ст20 они показали ухудшение ингибирующих свойств, на образцах из стали марки Ст3 эти соединения проявляют практически одинаковые свойства.

Ключевые слова: коррозия, ингибитор, изотиурониевые соединения, поляризационные кривые, уравнение Батлера – Фольмера

Для цитирования: Ушаков И.А., Никонова В.С., Польшинский И.В., Князева Л.Г., Польшинская М.М. Анциферов Е.А. Исследование эффективности ингибиторов коррозии на основе производных изотиурониевых солей. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 2. С. 326–332. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-326-332>

Study on efficiency of corrosion inhibitors based on derivatives of isothiuronic salts

Igor A. Ushakov*, Valentina S. Nikonova*, Igor V. Polynskii**,
Larisa G. Knyazeva***, Mariya M. Polynskaya****, Evgeniy A. Antsiferov**

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

**Irkutsk National Research Technical University,
Irkutsk, Russian Federation

***All-Russian Scientific Research Institute for the Use of Machinery
and Oil Products in Agriculture, Tambov, Russian Federation
****Irkutsk State Transport University,
Irkutsk, Russian Federation

Abstract: Metals play a pivotal role in industry; their use constantly grows. It is virtually impossible to find an industrial field without the use of metals and their alloys. However, owing to the quality degradation of metal during the operational process, corrosion appears not only on its surface but also under a coating, which leads to its destruction. To avoid this, corrosion inhibitors are necessary. Organic compounds have been widely used as corrosion inhibitors. Many organic corrosion inhibitors have been developed nowadays. In the literature, organic compounds comprising N, O, S and P heteroatoms are described, which reduce corrosion rate. The organic compounds are adsorbed on the metal surface, forming a thin layer. Adsorption occurs either through electrostatic interaction or, in some cases, the formation of covalent bonds. The work aimed to study isothiuronic salts as corrosion inhibitors to evaluate their protective properties using the polarisation curves method. Objects of research were isothiuronic compounds containing two active centres separated by saturated and unsaturated carbon bonds (structures 1–3). In structures 4–7, one isothiuronic fragment has different propylene substituting groups. It has been previously shown that these compounds can act as effective brightening agents when applying nickel coatings. A model solution with a density of 1.12 g/cm³ was prepared to study the corrosion inhibitors. The corrosion inhibitor concentration was 400 mg/L. Studies have shown that the compounds with two isothiuronic moieties do not always exhibit improved properties for inhibiting metal degradation in a corrosive environment. In particular, they showed worsening of the inhibiting properties for samples made of steel 20 and identical properties for that made of steel 3.

Keywords: corrosion, inhibitor, isothiuronic compounds, polarisation curves, Butler – Volmer equation

For citation: Ushakov IA, Nikonova VS, Polynskii IV, Knyazeva LG, Polynskaya MM, Antsiferov EA. Study on efficiency of corrosion inhibitors based on derivatives of isothiuronic salts. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(2): 326–332. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-326-332>

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что коррозия – это самопроизвольное разрушение металла под действием различных факторов окружающей среды (влажность, температура, наличие вредных примесей и др.). Усиление агрессивности среды ввиду увеличения вредных выбросов в атмосферу, сточные воды и пр. приводит к ускорению процессов коррозии, снижению механической прочности изделий и оборудования. Преждевременное ржавление металлоконструкций – это потенциальная возможность возникновения аварий, наносящих огромный экономический ущерб. Поэтому защите металлов от коррозии в последние годы уделяется все больше внимания.

Эффективным методом подавления коррозии металлов является добавление ингибиторов коррозии в коррозионную среду. В настоящее время разработано множество органических ингибиторов коррозии [1], которые содержат функциональные группы с гетероатомами, такими как сера, азот, фосфор, кислород и др. [2]. Считается, что гетероатом, присутствующий в органическом соединении, выступает в качестве фрагмента, взаимодействующего с активным адсорбционным центром на поверхности металла, в результате чего соединение ведет себя как идеальный ингибитор [3]. Азотсодержащие органические соединения являются лучшими ингибиторами коррозии в агрессивной соляной кислоте, тогда как серосодержащие соединения ведут

себя как хорошие ингибиторы в серной кислоте. Соединения, содержащие серу и азот, действуют как отличные ингибиторы коррозии для обеих сред [4]. Тиомочевина (диамидтиоугольной кислоты) и ее производные, содержащие одновременно два атома азота и один атом серы, демонстрируют лучшие ингибирующие свойства, чем чисто аминные ингибиторы в кислой среде [5–7].

Большое количество работ посвящено изучению тиомочевины и ее производных, содержащих полярные функциональные группы [8–10]. Ингибирующее поведение этих соединений обусловлено адсорбцией молекул ингибитора на металлической поверхности за счет координационных связей между атомами серы, азота и поверхностными атомами металла, сила связи которых зависит от электронной плотности и поляризации функциональных групп [11, 12]. Эти полярные фрагменты выступают как активные реакционные центры адсорбции. Было обнаружено, что присутствие атома серы может вызвать большую адсорбцию органического соединения, поскольку атом серы легко протонируется в кислой среде, тем самым являясь лучшим центром адсорбции, чем атом азота или атом кислорода [2].

Недавно синтезированные изотиуруниевые соли, содержащие в качестве заместителя фрагменты с двойной связью [13], представляют в этой связи значительный интерес. Введение в молекулу ингибитора двух изотиуруниевых фрагментов повышает концентрацию гетероато-

мов в одном объекте и, возможно, будет усиливать защитные свойства смолы.

Целью работы являлось исследование изотиуруниевых солей в качестве ингибиторов коррозии и оценка их защитных свойств методом поляризационных кривых.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Измерения и обработку результатов проводили на приборе PGSTAT302N (Metrohm Autolab) в программе NOVA 1.8, которая позволяет выполнить расчеты и построить эквивалентные схемы. Измерение коррозии проводили в подпрограмме измерения линейной поляризации в диапазоне потенциалов от -0,1 до 0,1 В, токов – от 100 до 1 мА в 3-электродной электрохимической ячейке. Рабочий электрод представлял собой металлический стержень с отполированной поверхностью и площадью поперечного сечения 0,75 см². Вспомогательным электродом служила платиновая пластина, а в качестве электрода сравнения был использован хлоридсеребряный электрод. Все измерения проводились при постоянном поддержании температуры в ячейке 25 °С.

Для исследования ингибиторов коррозии модельный раствор плотностью 1,12 г/см³ приготавливали по ГОСТ 9.506-87. Состав раствора, г/л: кальций хлористый 6-водный – 34, магний хлористый 6-водный – 17, натрий хлористый – 163, кальций сернокислый водный – 0,14. Концентрация ингибитора коррозии составляла 400 мг/л [14].

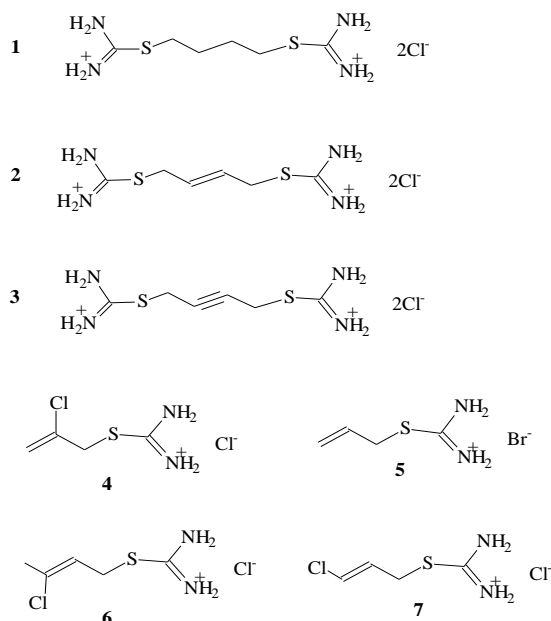


Рис. 1. Структурные формулы ингибиторов 1–7

Fig. 1. Structural formulas of inhibitors 1–7

Объектами исследований выступили изотиуруниевые соли (1–7), содержащие два активных центра (1–3), разделенных насыщенными и не-

насыщенными углеродными связями. В структурах соединений 4–7 один изотиуруниевый фрагмент имеет разные пропиленовые заместители (см. рис. 1). Ранее было показано, что при нанесении медных и никелевых покрытий соединения 4–7 могут выступать как эффективные блескообразователи [15, 16].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ наклона кривой Тафеля, осуществляемый методом поляризационных кривых, обеспечивает оценку поляризационного сопротивления и плотности тока обмена [17–20]. Точное определение этих параметров может быть выполнено путем преобразования уравнения Батлера – Фольмера для диапазона высоких поляризаций к набору экспериментальных данных с учетом того, что ток коррозии связан с поляризационным сопротивлением и наклонами Тафеля:

$$\frac{1}{i_{corr}} = R_p \cdot 2,303 \left(\frac{1}{b_a} + \frac{1}{b_k} \right), \quad (1)$$

где R_p – поляризационное сопротивление; b_a – анодный коэффициент Тафеля; b_k – катодный коэффициент Тафеля.

Выражение (1) можно использовать в сочетании с уравнением Батлера – Фольмера для нелинейного согласования данного равенства с набором данных.

Для высоких катодных или анодных перенапряжений уравнение Батлера – Фольмера может быть сведено к следующим линейным выражениям:

$$E - E_{corr} = \lg i_{corr} + b_a \lg |i|; \quad (2)$$

$$E - E_{corr} = \lg i_{corr} - b_k \lg |i|; \quad (3)$$

где i_{corr} – плотность тока коррозии.

Для исследованных соединений 1–7 на образцах стали марок Ст20 и Ст3 были получены поляризационные кривые (рис. 2). Экспериментальные значения i_{corr} и E_{corr} приведены в таблице. Защитная эффективность ингибиторов на разных сталях отличается друг от друга, например, на стали Ст3 наибольшей эффективностью обладает ингибитор 1, а на стали Ст20 – ингибитор 2. Наклоны Тафеля на анодных кривых близки для разных ингибиторов коррозии на сталях Ст3 и Ст20, следовательно, ионизация железа протекает по одному механизму:

$$Z, \% = 100 \cdot \frac{i_{кон} - i_{инг}}{i_{кон}}, \quad (4)$$

где Z – защитный эффект сопротивления переноса заряда анодной реакции; $i_{кон}$ – плотность тока коррозии контрольного образца; $i_{инг}$ – плотность тока коррозии с добавлением ингибитора.

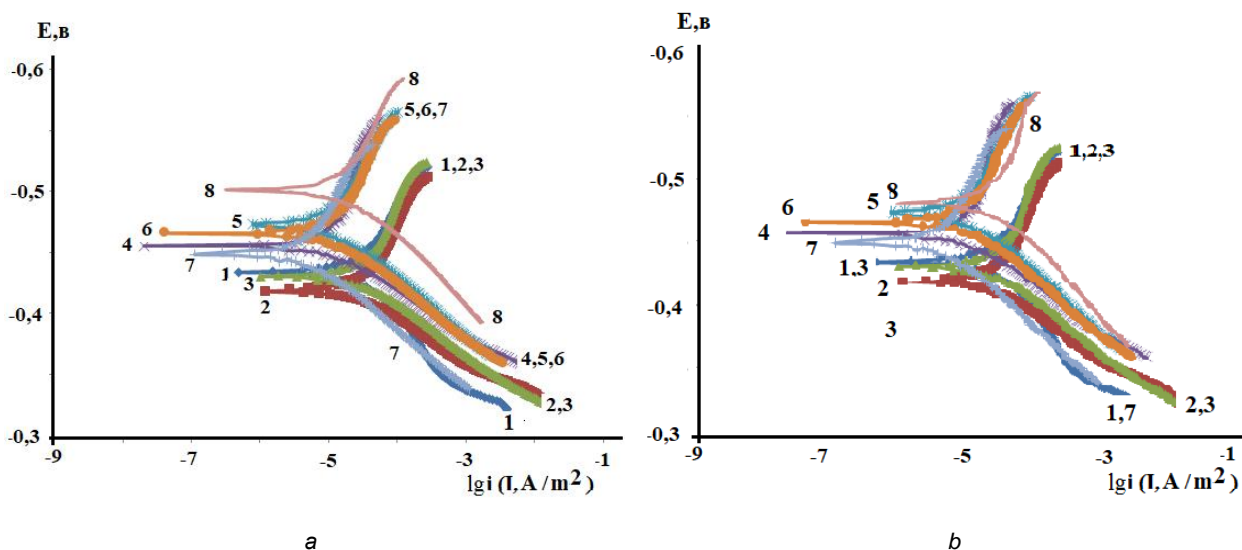


Рис. 2. Поляризационные кривые ингибиторов (1–7) и фон (8) на стали марок Ст3 (а) и Ст20 (b)

Fig. 2. Polarization curves of inhibitors (1–7) and background (8) on steel grades St3 (a) and St20 (b)

Экспериментальные значения тока и потенциала коррозии для ингибиторов 1–7. Время выдержки – 1 ч

Experimental values of current and corrosion potential for inhibitors 1–7. Exposure time – 1 h

| Ингибитор | E, V | $i \cdot 10^{-5}, A/m^2$ | b_a | b_k | $Z, \%$ |
|------------|--------|--------------------------|-------|-------|---------|
| Сталь Ст3 | | | | | |
| Контроль | -0,484 | 3,50 | 0,075 | 0,157 | – |
| 1 | -0,400 | 0,63 | 0,023 | 0,032 | 82 |
| 2 | -0,420 | 1,91 | 0,039 | 0,042 | 46 |
| 3 | -0,415 | 1,70 | 0,033 | 0,070 | 51 |
| 4 | -0,420 | 2,47 | 0,032 | 0,046 | 29 |
| 5 | -0,442 | 2,45 | 0,033 | 0,036 | 30 |
| 6 | -0,465 | 3,11 | 0,045 | 0,098 | 11 |
| 7 | -0,415 | 3,16 | 0,034 | 0,068 | 10 |
| Сталь Ст20 | | | | | |
| Контроль | -0,489 | 1,58 | 0,038 | 0,063 | – |
| 1 | -0,431 | 2,42 | 0,046 | 0,081 | c* |
| 2 | -0,423 | 0,17 | 0,036 | 0,012 | 89 |
| 3 | -0,432 | 2,82 | 0,042 | 0,082 | c |
| 4 | -0,454 | 1,21 | 0,036 | 0,157 | 24 |
| 5 | -0,482 | 0,85 | 0,039 | 0,062 | 46 |
| 6 | -0,471 | 0,76 | 0,038 | 0,042 | 52 |
| 7 | -0,464 | 0,38 | 0,049 | 0,046 | 76 |

*c – стимуляция коррозии.

Наибольший защитный эффект ингибиторов коррозии проявляется на стали Ст3, на стали Ст20 ингибиторы 1 и 3 являются стимуляторами коррозионных процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование изотиурониевых солей в качестве ингибиторов коррозии показало, что отдельные представители этих солей обладают защитными свойствами (см. таблицу).

Определено, что все исследованные соединения относятся к классу ингибиторов поверхностно-активного типа, так как тормозят процесс коррозии за счет адсорбции. Благодаря способности блокировать наиболее активные центры

корродирующего металла их можно отнести к ингибиторам блокировочного типа. А по признакам смещения поляризационных кривых их можно отнести к ингибиторам анодного типа.

Как показали исследования, ингибиторы коррозии, имеющие два изотиурониевых фрагмента, не всегда показывают улучшение свойств для ингибирования металла в коррозионной среде. В частности, на образцах стали Ст20 некоторые из них показали ухудшение ингибирующих свойств. На стали Ст3 эти соединения проявляют практически одинаковые свойства (см. таблицу). Различия в поведении ингибиторов связаны с их различным составом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sharma S., Kumar A. Recent advances in metallic corrosion inhibition: A review // *Journal of Molecular Liquids*. 2021. Vol. 322. P. 114862. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114862>
2. Özcan M., Dehri I., Erbil M. Organic sulphur-containing compounds as corrosion inhibitors for mild steel in acidic media: correlation between inhibition efficiency and chemical structure // *Applied Surface Science*. 2004. Vol. 236. Issue 1-4. P. 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2004.04.017>
3. Musa A.Y., Kadhum A.A.H., Mohamad A.B., Rahoma A.A.B., Mesmari H. Electrochemical and quantum chemical calculations on 4,4-dimethylloxazolidine-2-thione as inhibitor for mild steel corrosion in hydrochloric acid // *Journal of Molecular Structure*. 2010. Vol. 969. Issue 1-3. P. 233–237. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.02.051>
4. Sudheer S., Quraishi M.A. 2-Amino-3,5-dicarbonitrile-6-thio-pyridines: new and effective corrosion inhibitors for mild steel in 1 M HCL // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2014. Vol. 53. Issue 8. P. 2851–2859. <https://doi.org/10.1021/ie401633y>
5. Li X., Deng S., Fu H. Allylthiourea as a corrosion inhibitor for cold rolled steel in H₃PO₄ solution // *Corrosion Science*. 2012. Vol. 55. P. 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2011.10.025>
6. Quraishi M.A., Ansari F.A., Jamal D. Thiourea derivatives as corrosion inhibitors for mild steel in formic acid // *Materials Chemistry and Physics*. 2003. Vol. 77. Issue 3. P. 687–690. [https://doi.org/10.1016/S0254-0584\(02\)00130-X](https://doi.org/10.1016/S0254-0584(02)00130-X)
7. Fekry A.M., Mohamed R.R. Acetyl thiourea chitosan as an eco-friendly inhibitor for mild steel in sulphuric acid medium // *Electrochimica Acta*. 2010. Vol. 55. Issue 6. P. 1933–1939. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.11.011>
8. Gao Z., Cao X., Liu L., Fang Y., Hu L. Properties of organic/inorganic hybrid coatings formed on X. magnesium alloy surface // *Chinese Journal of Materials Research*. 2017. Vol. 31. Issue 3. P. 211–218. <https://doi.org/10.11901/1005.3093.2016.240>
9. Korkmaz N., Obaidi O.A., Senturk M., Astley D., Ekinici D., Supuran C.T. Synthesis and biological activity of novel thiourea derivatives as carbonic anhydrase inhibitors // *Journal Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2015. Vol. 30. Issue 1. P. 75–80. <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.879656>
10. El-Faham A., Osman S.M., Al-Lohedan H.A., El-Mahdy G.A. Hydrazino-methoxy-1,3,5-triazine derivatives' excellent corrosion organic inhibitors of steel in acidic chloride solution // *Molecules*. 2016. Vol. 21. Issue 6. P. 714–727. <https://doi.org/10.3390/molecules21060714>
11. Torres V.V., Rayol V.A., Magalhães M., Viana G.M., Aguiar L.C.S., Machado S.P., et al. Study of thioureas derivatives synthesized from a green route as corrosion inhibitors for mild steel in HCl solution // *Corrosion Science*. 2014. Vol. 79. P. 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2013.10.032>
12. Shahabia S., Norouzi P., Ganjali M.R. Electrochemical and theoretical study of the inhibition effect of two synthesized thiosemicarbazide derivatives on carbon steel corrosion in hydrochloric acid solution // *RSC Advances*. 2015. Vol. 5. Issue 27. P. 20838–20847. <https://doi.org/10.1039/c4ra15808c>
13. Levanova E.P., Grabel'nykh V.A., Vakhri-na V.S., Russavskaya N.V., Albanov A.I., Korchevin N.A., et al. Synthesis of new 2-(alkenyl-sulfanyl)pyrimidine derivatives // *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2014. Vol. 50. Issue 3. P. 429–433. <https://doi.org/10.1134/S1070428014030221>
14. Рахманкулов Д.Л., Бугай Д.Е., Габитов А.И., Голубев М.В., Лаптев А.Б., Калимуллин А.А. Ингибиторы коррозии. Т. 1. Основы теории и практики применения. Уфа: Реактив, 1997. 296 с.
15. Березовский В.И., Сосновская Н.Г., Добрынина Н.Н. Применение изотиурониевых солей в качестве блескообразующих добавок при меднении // *Современные технологии и научно-технический прогресс* 2020. Т. 1. N 7. С. 19–20. <https://doi.org/10.36629/2686-9896-2020-1-19-20>
16. Сосновская Н.Г., Истомина Н.В., Синеговская Л.М., Розенцвейг И.Б., Корчевин Н.А. Электроосаждение блестящих никелевых покрытий из сульфатного электролита в присутствии изотиурониевых солей // *Гальванотехника и обработка поверхности*. 2019. Т. 27. N 4. С. 4–11. https://doi.org/10.47188/0869-5326_2019_27_4_4
17. Алцыбеева А.И., Левин С.З. Ингибиторы коррозии металлов / под ред. проф. Л.И. Антропова. Л.: Химия, 1968. 264 с.
18. Kozaderov O.A., Koroleva O.V., Vvedenskii A.V. Kinetics of phase transformations in a binary alloy surface layer at the selective dissolution. I. Theoretical analysis // *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2009. Vol. 45. Issue 1. P. 31–35. <https://doi.org/10.1134/S2070205109010043>
19. Kuznetsov Yu.I., Makarov D.A., Vershok D.B. Accelerator of steel oxidation in ammonium nitrate solutions // *Protection of Metals*. 2004. Vol. 40. Issue 1. P. 3–6. <https://doi.org/10.1023/B:PROM.0000013104.66432.fe>
20. Kharitonov D.S., Kurilo I.I., Zharskii I.M. Effect of sodium vanadate on corrosion of AD31 aluminum alloy in acid media // *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2017. Vol. 90. Issue 7. P. 1089–1097. <https://doi.org/10.1134/S1070427217070102>

REFERENCES

1. Sharma S, Kumar A. Recent advances in metallic corrosion inhibition: A review. *Journal of Molecular Liquids*. 2021;322:114862. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114862>
2. Özcan M, Dehri I, Erbil M. Organic sulphur-containing compounds as corrosion inhibitors for

mild steel in acidic media: correlation between inhibition efficiency and chemical structure. *Applied Surface Science*. 2004;236(1-4):155–164. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2004.04.017>

3. Musa AY, Kadhum AAH, Mohamad AB, Rahoma AAB, Mesmari H. Electrochemical and quantum chemical calculations on 4,4-dimethylloxazolidine-2-thione as inhibitor for mild steel corrosion in hydrochloric acid. *Journal of Molecular Structure*. 2010;969(1-3):233–237. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2010.02.051>

4. Sudheer S, Quraishi MA. 2-Amino-3,5-dicarbonitrile-6-thio-pyridines: new and effective corrosion inhibitors for mild steel in 1 M HCL. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2014;53(8):2851–2859. <https://doi.org/10.1021/ie401633y>

5. Li X, Deng S, Fu H. Allylthiourea as a corrosion inhibitor for cold rolled steel in H₃PO₄ solution. *Corrosion Science*. 2012;55:280–288. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2011.10.025>

6. Quraishi MA, Ansari FA, Jamal D. Thiourea derivatives as corrosion inhibitors for mild steel in formic acid. *Materials Chemistry and Physics*. 2003;77(3):687–690. [https://doi.org/10.1016/S0254-0584\(02\)00130-X](https://doi.org/10.1016/S0254-0584(02)00130-X)

7. Fekry AM, Mohamed RR. Acetyl thiourea chitosan as an eco-friendly inhibitor for mild steel in sulphuric acid medium. *Electrochimica Acta*. 2010;55(6):1933–1939. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2009.11.011>

8. Gao Z, Cao X, Liu L, Fang Y, Hu L. Properties of organic/inorganic hybrid coatings formed on X. magnesium alloy surface. *Chinese Journal of Materials Research*. 2017;31(3):211–218. <https://doi.org/10.11901/1005.3093.2016.240>

9. Korkmaz N, Obaidi OA, Senturk M, Astley D, Ekinci D, Supuran CT. Synthesis and biological activity of novel thiourea derivatives as carbonic anhydrase inhibitors. *Journal Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2015;30(1):75–80. <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.879656>

10. El-Faham A, Osman SM, Al-Lohedan HA, El-Mahdy GA. Hydrazino-methoxy-1,3,5-triazine derivatives' excellent corrosion organic inhibitors of steel in acidic chloride solution. *Molecules*. 2016;21(6):714–727. <https://doi.org/10.3390/molecules21060714>

11. Torres VV, Rayol VA, Magalhães M, Viana GM, Aguiar LCS, Machado SP, et al. Study of thioureas derivatives synthesized from a green route as corrosion inhibitors for mild steel in HCl solution.

Corrosion Science. 2014;79:108–118. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2013.10.032>

12. Shahabia S, Norouzi P, Ganjali MR. Electrochemical and theoretical study of the inhibition effect of two synthesized thiosemicarbazide derivatives on carbon steel corrosion in hydrochloric acid solution. *RSC Advances*. 2015;5(27):20838–20847. <https://doi.org/10.1039/c4ra15808c>

13. Levanova EP, Grabel'nykh VA, Vakhrina VS, Russavskaya NV, Albanov AI, Korchevin NA, et al. Synthesis of new 2-(alkenylsulfanyl)pyrimidine derivatives. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2014;50(3):429–433. <https://doi.org/10.1134/S1070428014030221>

14. Rahmankulov DL, Bugaj DE, Gabitov AI, Golubev MV, Laptev AB, Kalimullin AA. *Corrosion inhibitors*. Vol. 1. *Fundamentals of theory and practice of application*. Ufa: Reaktiv; 1997. 296 p. (In Russian)

15. Berezovsky VI, Sosnovskaya NG, Dobrynina NN. Application of isothiuronium salts as luster-forming additives in copper plating. *Sovremennye tekhnologii i nauchno-tekhnicheskii progress*. 2020;1(7):19–20. (In Russian) <https://doi.org/10.36629/2686-9896-2020-1-19-20>

16. Sosnovskaya NG, Istomina NV, Sinegovskaya LM, Rosenzweig IB, Korchevin NA. Electrodeposition of bright nickel coatings from sulfate electrolyte in the presence of isothiuronium salts. *Gal'vanotekhnika i obrabotka poverkhnosti*. 2019;27(4):4–11. (In Russian) https://doi.org/10.47188/0869-5326_2019_27_4_4

17. Altsybeeva AI, Levin SZ. *Metal corrosion inhibitors*. Leningrad: Khimiya; 1968. 264 p. (In Russian)

18. Kozaderov OA, Koroleva OV, Vvedenskii AV. Kinetics of phase transformations in a binary alloy surface layer at the selective dissolution. I. Theoretical analysis. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 2009;45(1):31–35. <https://doi.org/10.1134/S2070205109010043>

19. Kuznetsov Yul, Makarov DA, Vershok DB. Accelerator of steel oxidation in ammonium nitrate solutions. *Protection of Metals*. 2004;40(1):3–6. <https://doi.org/10.1023/B:PROM.0000013104.66432.fe>

20. Kharitonov DS, Kurilo II, Zharskii IM. Effect of sodium vanadate on corrosion of AD31 aluminum alloy in acid media. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2017;90(7):1089–1097. <https://doi.org/10.1134/S1070427217070102>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ушаков Игорь Алексеевич,
к.х.н., старший научный сотрудник,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
e-mail: ushakov@irioc.irk.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Igor A. Ushakov,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, A.E. Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: ushakov@irioc.irk.ru

Никонова Валентина Сергеевна,
к.х.н., научный сотрудник,
Иркутский институт химии
им. А.Е. Фаворского СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1,
Российская Федерация,
e-mail: vahrina@irioch.irk.ru

Valentina S. Nikonova,
Cand. Sci. (Chemistry), Researcher,
A.E. Favorsky Irkutsk Institute
of Chemistry SB RAS,
1, A.E. Favorsky St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
e-mail: vahrina@irioch.irk.ru

Полинский Игорь Владимирович
аспирант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
✉e-mail: polinigor@yandex.ru

Igor V. Polynskii,
Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical
University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
✉e-mail: polinigor@yandex.ru

Князева Лариса Геннадьевна,
д.х.н., главный научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский
институт использования техники
и нефтепродуктов в сельском хозяйстве,
392022, г. Тамбов, пер. Ново-Рубежный, 28,
Российская Федерация,
e-mail: knyazeva27@mail.ru

Larisa G. Knyazeva,
Dr. Sci. (Chemistry), Chief Researcher,
All-Russian Scientific Research Institute
for the Use of Machinery and Oil Products
in Agriculture,
28, Novo-Rubizhny Lane, Tambov, 392022,
Russian Federation,
e-mail: knyazeva27@mail.ru

Полинская Мария Михайловна,
к.э.н., доцент,
Иркутский государственный университет
путей сообщения,
664074, г. Иркутск, ул. Чернышевского, 15,
Российская Федерация,
e-mail: marypo1976@yandex.ru

Mariya M. Polynskaya,
Cand. Sci. (Economy), Associate Professor,
Irkutsk State Transport University,
15, Chernyshevsky St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: marypo1976@yandex.ru

Анциферов Евгений Александрович,
к.х.н., директор Института высоких технологий,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
e-mail: antsiferov@istu.edu

Evgeniy A. Antsiferov,
Cand. Sci. (Chemistry),
Director of High Technologies Institute,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
e-mail: antsiferov@istu.edu

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

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

*Поступила в редакцию 09.10.2020.
Одобрена после рецензирования 29.12.2020.
Принята к публикации 31.05.2021.*

*The article was submitted 09.10.2020.
Approved after reviewing 29.12.2020.
Accepted for publication 31.05.2021.*

Уважаемые читатели!

Приглашаем Вас к активному творческому сотрудничеству по научным направлениям:

- Химические науки
- Физико-химическая биология
- Химическая технология

Журнал «Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология» включен в перечень рецензируемых научных изданий (**Перечень ВАК**) и следующие базы данных: Web of Science (**ESCI**), Chemical Abstracts Service (**CAS**), **EBSCO** Publishing Databases, European Reference Index for the Humanities and the Social Sciences (**ERIH PLUS**), **ВИНИТИ РАН**, система Российского индекса научного цитирования, представлен в электронной библиотеке «**Cyberleninka**», Directory of Open Access Journals (**DOAJ**) и описан в **Ulrich's Periodicals Directory**.

Публикациям журнала присваивается **DOI (Digital object identifier)**.

Редколлегия

Dear readers!

We would like to invite you to creative cooperation in the fields:

- Chemical Sciences
- Physical-Chemical and General Biology
- Chemical Technology

The Journal «Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya» is included in the list of journals which are regarded as academic publications by the State Commission for Academic Degrees and Titles (**ВАК**). The Journal also is indexing in Web of Science (**ESCI**), Chemical Abstracts Service (**CAS**), **EBSCO** Publishing Databases, European Reference Index for the Humanities and the Social Sciences (**ERIH PLUS**), **VINITI** Database (Referativnyi Zhurnal), Russian Science Citation Index, included in the digital scientific library **Cyberleninka**, Directory of Open Access Journals (**DOAJ**) and is described in **Ulrich's Periodicals Directory**.

Publications are assigned a **DOI (Digital object identifier)**.

Editorial Board

ИЗВЕСТИЯ ВУЗОВ
Прикладная химия и биотехнология
Том 11 N 2 (37) 2021

12+

PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES
Applied chemistry and biotechnology
Volume 11 No. 2 2021

Редактор О.А. Терновская
Перевод на английский язык: Thomas A. Beavitt, Anastasia Stošić,
Н.Г. Попова, Е.А. Привалова
Компьютерный набор и верстка А.В. Куртовой
Ответственный за выпуск Ю.Н. Пожидаев

Дата выхода в свет 30.06.2021. Формат 60 x 90 / 8.
Бумага офсетная. Печать цифровая. Усл. печ. л. 20.
Тираж 500 экз. Зак. 110. Поз. плана 5н.

Отпечатано в типографии издательства
ФГБОУ ВО «Иркутский национальный
исследовательский технический университет»
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83

Издание распространяется бесплатно
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83

Адрес типографии:
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 81/12А